

UNTERSUCHUNGEN ZUR REIFUNG
DER VORSTUFEN-PROTEINE EINES
PRIMATEN-SARKOM-VIRUS

HANS-GEORG KRÄUSSLICH

Diss.
München
1985

Aus dem Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und
medizinische Mikrobiologie der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. F. Deinhardt

UNTERSUCHUNGEN ZUR REIFUNG DER
VORSTUFEN-PROTEINE EINES PRIMATEN-SARKOM-VIRUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans-Georg Kräusslich
aus
Passau

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. K. von der Helm

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Deinhardt

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. März 1985

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

DANKSAGUNG

Herrn Priv. Doz. Dr. Klaus von der Helm danke ich für die Überlassung des Themas, für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und im besonderen für die praktische und theoretische Betreuung der Arbeit

Herrn Prof. Dr. Friedrich Deinhardt danke ich für die stete Unterstützung der Arbeit sowie für sein Interesse

Ganz besonders danken möchte ich Dietlinde Rose, Dr. Martina Born und Gerhild McGregor, die durch unzählige wertvolle Hinweise und Ratschläge wesentlich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. ÜBERSICHT ÜBER DIE RNS-TUMORVIREN	4
2.1. <u>Das System der RNS-Tumorviren</u>	4
2.2. <u>Das Primaten-Sarkom-Virus SSV/SSAV</u>	8
2.3. <u>Synthese und Reifung der Strukturproteine bei RNS-Tumorviren</u>	12
3. EXPERIMENTELLER TEIL	17
3.1. <u>Zellen</u>	17
3.2. <u>Gewebekulturtechniken</u>	18
3.2.1. Kultivierung der Zellen auf Petrischalen	18
3.2.2. Kultivierung der Zellen auf Rollflaschen	18
3.2.3. Überinfizierung SSV-transformierter, keine Partikel produzierender Zellen mit dem Helfervirus SSAV (" <u>rescue</u> ")	19
3.3. <u>Nachweis der Virusvermehrung</u>	20
3.3.1. Polymerasetest	20
3.3.2. Fokustest	21
3.4. <u>Darstellung zellfreier Viruspartikel</u>	22
3.4.1. Pelletierung der Partikel	22
3.4.2. Reinigung der Partikel durch Dichtegradientenzentrifugation	23

	Seite
3.4.3. Präparation der gereinigten Viruspartikel	24
3.5. <u>Radioaktive Markierung der Zellen und Viruspartikel</u>	24
3.5.1. Markierung der Zellen mit ^{35}S -Methionin	24
3.5.2. Darstellung ^{35}S -Methionin bzw. ^3H -Uridin markierter zellfreier Viruspartikel	25
3.6. <u>Isolierung definierter Proteine</u>	27
3.6.1. Isolierung von Proteinen durch Immunpräzipitation	27
3.6.1.1. Antiseren	27
3.6.1.2. Immunpräzipitation intrazellulärer SSV/SSAV-spezifischer Antigene	28
3.6.1.3. Darstellung viraler Antigene in den Viruspartikeln mittels Immunpräzipitation	29
3.6.2. Fraktionierung der Proteine der Viruspartikel durch Auftrennen über ein Molekularsieb	30
3.7. <u>Reaktionsbedingungen der in vitro-Spaltung isolierter SSV/SSAV-spezifischer Proteine</u>	32
3.7.1. Reaktionsbedingungen der Spaltung mit der p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus	32
3.7.2. Reaktionsbedingungen der Spaltung mit der SSV/SSAV-assoziierten Protease	33
3.7.3. Reaktionsbedingungen der Spaltung mit der Protease aus Extrakten von lysierten Zellen	35
3.8. <u>Analytische Methoden</u>	36
3.8.1. Quantitative Präzipitation der Gesamtproteine	36

	Seite
3.8.2. Elektrophoretische Auftrennung	38
3.8.2.1. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	38
3.8.2.2. Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von Harnstoff und Acetatpuffer	42
3.8.3. Bestimmung der Radioaktivität	43
3.8.4. Proteinbestimmungsmethoden	44
4. ERGEBNISSE	45
4.1. <u>Untersuchungen über die Produktion von infektiösen, transformierenden Viruspartikeln in den Zellen</u>	45
4.1.1. Untersuchungen zur Freisetzung von Viruspartikeln aus den Zellen	45
4.1.2. Untersuchungen zur Polymeraseaktivität in zellfreien Mediumüberständen	49
4.1.3. Untersuchungen zur transformierenden Eigenschaft der Viruspartikel	51
4.2. <u>Darstellung der spezifischen Proteine des SSV/SSAV</u>	54
4.3. <u>Untersuchungen zur Spaltung SSV/SSAV-spezifischer Vorstufen-Proteine in der infizierten Zelle</u>	58
4.3.1. Darstellung SSV/SSAV-spezifischer Proteine in der infizierten Zelle	58
4.3.2. Spaltungsreifung der Vorstufen-Proteine in der Wirtszelle (<u>in vivo</u>)	64
4.3.2.1. Spaltungsreifung der Kapsid-Proteine (<u>gag</u>)	65

	Seite
4.3.2.2. Spaltungsreifung der Hüllproteine (<u>env</u>)	70
4.3.3. <u>In vitro</u> -Spaltung isolierter Vorstufen-Proteine mit der p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus	71
4.3.3.1. Charakterisierung der p15-Protease	71
4.3.3.2. Kinetik der <u>in vitro</u> -Spaltung mit p15-Protease	73
4.3.3. <u>In vitro</u> -Spaltung isolierter Vorstufen-Proteine mittels SSV/SSAV-assoziiierter proteolytischer Aktivität	84
4.3.4.1. Nachweis einer SSV/SSAV-assoziierten proteolytischen Aktivität	84
4.3.4.2. Charakterisierung des SSV-assoziierten proteolytischen Faktors	92
4.4. <u>Untersuchungen zur Spaltung spezifischer intermediärer Vorstufen-Proteine in gereinigten SSV/SSAV-Partikeln</u>	99
4.4.1. Vergleichende Darstellung der Proteine "früh" und "spät" geernteter Partikel	100
4.4.2. <u>In vitro</u> -Spaltung des aus SSV/SSAV-Partikeln isolierten Vorstufen-Proteins	103
4.4.2.1. Inkubation ohne Zugabe einer proteolytischen Aktivität	103
4.4.2.2. Spaltung mit p15-Protease	108
4.4.2.3. Spaltung mittels SSV/SSAV-assoziiierter proteolytischer Aktivität	109

		Seite
5.	DISKUSSION	111
5.1.	<u>Spaltung der Vorstufen-Proteine des SSV/SSAV in vivo</u>	113
5.2.	<u>In vitro-Spaltung des Vorstufen-Proteins des SSV/SSAV</u>	119
5.3.	<u>Der proteolytische Faktor des SSV</u>	124
6.	ZUSAMMENFASSUNG	128
7.	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	130
8.	LITERATURVERZEICHNIS	133

1. EINLEITUNG

Die Erforschung maligner Erkrankungen nimmt eine zentrale Position in der modernen Medizin ein. Als exogene Ursachen der Entstehung von Malignomen wurden bisher ionisierende Strahlen, chemische Stoffe und verschiedene Viren diskutiert. Dabei konnten onkogene Viren aus primären und sekundären Tumoren der meisten untersuchten Tierarten isoliert werden. Diese Viren können nach Inokulation in gesunde Tiere entsprechender Spezies u.a. Leukämien, Sarkome und Karzinome verursachen. Außerdem können sie auch Zellkulturen nach in vitro-Infektion transformieren.

Die bei Primaten gefundenen onkogenen Viren unterteilen sich in die onkogenen DNS-Viren und in die RNS-Tumorviren (Retroviren). Zu den onkogenen DNS-Viren zählen die nicht humanen Primaten Viren wie Herpesvirus saimiri und ateles, sowie die humanen Herpesviren, insbesondere das Epstein-Barr-Virus. Zur Gruppe der RNS-Tumorviren der nicht humanen Primaten gehören Retroviren verschiedener Affenarten, die Leukämien oder Sarkome verursachen können. In jüngster Zeit wurde aus Lymphozyten von Patienten mit T-Zell-Leukämien und T-Zell-Lymphomen auch ein humanes RNS-Tumorvirus isoliert (Poiesz et al., 1980; Hinuma et al., 1981). Damit scheinen, wie bei allen anderen untersuchten Säugetieren, auch beim Menschen onkogene Retroviren an der Entstehung maligner Erkrankungen beteiligt zu sein.

Die genauen Vorgänge bei der Transformation der Wirtszelle durch ein onkogenes Retrovirus sind im einzelnen

noch nicht bekannt. Bei den meisten onkogenen Retroviren wurden jedoch für die Transformation der Zelle verantwortliche Gene, die sogenannten Onkogene (virale Onkogene, v-onc) gefunden. Den viralen Onkogenen homologe DNS-Sequenzen wurden auch im Genom von allen untersuchten normalen, nicht transformierten Zellen nachgewiesen. Dies sind die Proto-Onkogene (zelluläre Onkogene, c-onc). Sie sind im Laufe der Evolution weitgehend konserviert geblieben und kommen in allen Spezies des Tierreichs vor. Einerseits besitzen sie wichtige, vermutlich regulierende Funktionen in der Normalzelle, andererseits haben sie jedoch eine potentiell karzinogene Wirkung. Die Frage, warum Zellen, die den Onkogenen homologe DNS-Sequenzen in ihrem Genom enthalten, nicht per se transformiert sind, läßt sich heute noch nicht endgültig beantworten. Das karzinogene Potential der Proto-Onkogene wird vermutlich durch genetische Veränderungen aktiviert, die entweder das Strukturgen selbst betreffen oder aber den Grad seiner Expression. Einerseits besteht die Hypothese, daß für die Transformation der Zelle eine wesentlich gesteigerte Expression des c-onc Gens und damit eine erheblich höhere Konzentration seines Genprodukts in der Zelle notwendig ist (quantitative Hypothese), andererseits wäre es möglich, daß das c-onc Gen erst eine Mutation durchmachen muß, um karzinogen zu wirken (qualitative Hypothese).

Ein Ansatz, die Entstehung maligner Erkrankungen zu verhindern, besteht jedenfalls in dem Versuch, die Vermehrung der Tumorstoffe und die Verbreitung ihres onkogenen Potentials zu unterbinden. Dies kann u.a. durch eine Blockierung der Replikation des Virus erreicht werden, die zur Folge hat, daß keine Vermehrung infektiöser Viruspartikel mehr stattfinden kann.

Es war das Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit, die genauen Vorgänge bei der Reifung der Strukturproteine eines onkogenen Retrovirus zu untersuchen. Es wurde das Modell des Primaten-Sarkom-Virus SSV/SSAV gewählt, um eine möglichst große Nähe zum menschlichen System zu erreichen. Eine genaue Kenntnis der untersuchten Vorgänge sollte die Voraussetzungen für die Entwicklung von Methoden schaffen, die eine Reifung der Strukturproteine und damit die Replikation und Vermehrung des onkogenen Virus verhindern.

2. ÜBERSICHT ÜBER DIE RNS-TUMORVIREN

2.1. Das System der RNS-Tumoviren

Obwohl die Geschichte der Tumoviren bereits 1908 mit der ersten zellfreien Übertragung einer Hühner-Erythroblastose begann, dauerte es noch 30 Jahre bis zur Entdeckung des Bittner'schen Milchkaktors, des ersten RNS-Tumovirus beim Säugetier. In der Folgezeit wurden zahlreiche weitere RNS-Tumoviren bei anderen Säugetieren gefunden, doch erst nach weiteren 30 Jahren wurden die ersten RNS-Tumoviren bei Primaten entdeckt (Chopra und Mason, 1970; Theilen et al., 1971; Wolfe et al., 1971). Obwohl seither von verschiedenen Forschergruppen die Isolierung eines menschlichen RNS-Tumovirus berichtet wurde, gelang bisher kein eindeutiger Nachweis für die Erzeugung onkogener Effekte durch derartige Viren beim Menschen. Erst mit der Isolierung eines RNS-Tumovirus aus T-Lymphozyten von verschiedenen Patienten mit T-Zell-Leukämien und T-Zell-Lymphomen (Poiesz et al., 1980; 1981; Hinuma et al., 1981) und dem Nachweis von Antikörpern gegen dieses Virus bei den Erkrankten und nahen Angehörigen, nicht jedoch bei Kontrollpersonen (Kalyanaraman et al., 1981) scheint der Nachweis eines RNS-Tumovirus beim Menschen gelungen.

Die RNS-Tumoviren gehören zur Familie der Retroviren (Dalton et al., 1974), deren Name sich aus ihrem besonderen Kennzeichen ableitet, nämlich dem Besitz des Enzyms Reverse Transkriptase, das in der Lage ist, die vi-

rale RNS in eine komplementäre DNS umzuschreiben (Temin, 1970; Baltimore, 1970). Dieses Enzym ermöglicht es somit, daß die genetische Information eines RNS-Virus als DNS-Kopie in das Genom der Wirtszelle integriert werden kann.

Die Replikation aller Retroviren erfolgt nach dem gleichen Schema: Ein vermehrungsfähiges Viruspartikel heftet sich mit seinen Hüllproteinen an die Oberfläche der Wirtszelle an und dringt in die Zelle ein. Die Virus-RNS wird im Zytoplasma durch die Reverse Transkriptase in eine komplementäre DNS umgeschrieben und diese wird in den Zellkern transportiert. Dort wird sie nach einer kurzen oder längeren Zwischenphase als Episom schließlich als sogenanntes Provirus in die zelluläre DNS integriert (Temin und Baltimore, 1972). Anschließend erfolgt die Transkription der integrierten Provirus-DNS, die wie ein zelluläres Gen kontrolliert wird. Die Synthese der Proteine erfolgt zunächst in der Form von Vorstufen; diese Vorstufen-Proteine werden dann sukzessive in die Strukturproteine des Virus gespalten und zusammen mit der RNS verpackt. Dann werden die Viruspartikel durch Knospung ("budding") von der Zellmembran aus der Wirtszelle freigesetzt.

Besondere Aufmerksamkeit in diesem Vermehrungszyklus verdient die Synthese und Spaltung der Vorstufen-Proteine. Diese Reifung der Virusproteine scheint am ehesten für eine Manipulation von außen zugänglich zu sein und somit die Möglichkeit zu bieten, die Vermehrung des Virus spezifisch zu inhibieren.

Die Familie der Retroviren wird nach elektronenoptischen Gesichtspunkten in die Typen A, B, C und D einge-

teilt (Bernhardt, 1958; 1960; Gelderblom et al., 1974). Die A-Typ Partikel scheinen Vorläufer der B- und C-Typ Partikel darzustellen. Zwar wurde ein D-Typ Partikel, das Mason-Pfizer-Affen-Virus (MPMV), ursprünglich aus einem Mammarkarzinom eines Rhesusaffen isoliert (Chopra und Mason, 1970), jedoch handelt es sich dabei nicht um ein onkogenes Virus. Bisher wurde noch für kein D-Typ Partikel eine onkogene Potenz nachgewiesen. Die bisher bekannten onkogenen Retroviren gehören also ausnahmslos zu den B- und C-Typ Partikeln, die im folgenden auch als Oncorna-Viren bezeichnet werden. Dabei sind von den bekannten Oncorna-Viren nur die Viren, die das Mammarkarzinom der Maus hervorrufen, den B-Typ Partikeln zuzuordnen. Die weitaus meisten Tumoviren der Säugetiere, Geflügel und Reptilien, darunter alle in der vorliegenden Untersuchung beschriebenen, gehören zu den C-Typ Partikeln.

Die Morphologie aller C-Typ Partikel ist weitgehend ähnlich. Sie besitzen ein Nukleokapsid aus Strukturproteinen, die die Virus-RNS umschließen, und eine äußere Hülle, die aus virusspezifischen Glykoproteinen und aus wirtszellspezifischen Lipoproteinen aufgebaut ist. Im Inneren des Nukleokapsids liegen zwei identische RNS-Einzelstränge von etwa 5-11 Kilobasen (je nach Typ), was einem Molekulargewicht von $2-3 \times 10^6$ d entspricht (Duesberg et al., 1974; Kung et al., 1976).

Diese RNS enthält z.B. beim Rous-Sarkom-Virus vier Gene. Die ersten drei kodieren für die zur Replikation des Virus notwendigen Strukturproteine, nämlich für die Kapsid-Proteine (gag), für die Reverse Transkriptase (pol) und für die Glykoproteine der äußeren Hülle (env). Das vierte Gen, das Onkogen, enthält die Information, die zur Transformation der Wirtszelle notwendig ist.

Das Genprodukt dieses Onkogens konnte für das Rous-Sarkom-Virus als Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 60000 d (pp60 src) identifiziert werden (Brugge und Erikson, 1977). Es besitzt eine Protein-Kinase-Aktivität (Collet und Erikson, 1978), die die Eigenschaft hat, anders als die bisher bekannten zellulären Kinasen, Tyrosin-Reste, an Stelle von Serin- oder Threonin-Resten, zu phosphorylieren (Hunter und Sefton, 1980). Inzwischen wurde auch bei anderen C-Typ Viren der Geflügel (Feldman et al., 1980; Kawai et al., 1980; Neil et al., 1981) und der Säugetiere (Shih et al., 1979; Reynolds et al., 1980; van de Ven et al., 1980; Witte et al., 1980) ein entsprechendes, für die Transformation verantwortliches Protein als Genprodukt des Onkogens gefunden. Ein Teil dieser Genprodukte verschiedener Onkogene hat den gleichen Typ von Protein-Kinase wie das pp60 src des Rous-Sarkom-Virus. Demnach scheint dieser Kinaseaktivität eine wichtige Rolle bei der Transformation der Zelle durch ein C-Typ Partikel zuzukommen.

Inzwischen wurden auch in normalen, nicht transformierten Zellen verschiedener Spezies Nukleinsäuresequenzen gefunden, die den Onkogenen von C-Typ Partikeln homolog sind. Diese Sequenzen sind in der Evolution sehr gut erhalten, sie finden sich bei den verschiedensten Tier-spezies und auch beim Menschen. Ebenso wurde das pp60 src, das Genprodukt des Onkogens des Rous-Sarkom-Virus, auch in normalen, nicht transformierten Zellen entdeckt. Dort war es jedoch in wesentlich geringerer Konzentration vorhanden (Rohrschneider et al., 1979). Das Onkogen und sein Genprodukt scheinen also eine notwendige Funktion in der nicht transformierten Zelle zu haben. Möglicherweise ist jedoch die Aktivierung dieses Onkogens durch Infektion mit einem Tumovirus und die

Störung der normalen Regulation der Wirtszelle für die Transformation von entscheidender Bedeutung.

2.2. Das Primaten-Sarkom-Virus SSV/SSAV

Die erste Isolation eines C-Typ Retrovirus bei einem Primaten gelang aus multiplen, spontan aufgetretenen Fibrosarkomen eines drei Jahre alten Wolläffchens (Theilen et al., 1971; Wolfe et al., 1971). Dieses Virus verursachte in Marmosets bei intramuskulärer Infektion Fibrosarkome (Wolfe et al., 1971), bei intrathekalen Infektionen Gliome (Johnson et al., 1975) und konnte Zellen verschiedener Spezies nach in vitro-Infektion transformieren (Wolfe et al., 1972; Aaronson et al., 1973). Aus den transformierten Zellen konnte jeweils ein transformierendes und ein nicht transformierendes Virus isoliert werden, die als Simian-Sarkom-Virus (SSV) und als Simian-Sarkom-assoziiertes-Virus (SSAV) bezeichnet wurden. Die isolierten Viren waren elektronenoptisch als C-Typ Partikel identifizierbar (Theilen et al., 1971), sie hatten die typische Morphologie dieser Viren und enthielten zwei identische RNS-Einzelstränge sowie das Enzym Reverse Transkriptase (Jensik et al., 1973).

In der Folgezeit fand man, daß das SSV ein replikationsdefektes Virus ist (Scolnick und Parks, 1973; Aaronson et al., 1973). Es ist alleine nicht zur Replikation fähig, sondern benötigt dazu die Anwesenheit des nicht transformierenden Helfervirus SSAV. Zur Transformation

der Wirtszelle ist das Helfervirus jedoch nicht notwendig.

Die mit dem Komplex SSV/SSAV infizierten Zellen produzieren stets einen 90-100fachen Überschuß an Helfervirus SSAV (Wolfe et al., 1972; Born, 1981). Man erhält daher bei einer Virusreinigung nur eine verhältnismäßig geringe Menge an transformierendem Virus. Um das SSV-Genom genauer zu studieren, wurden deshalb SSV-transformierte Zellen selektioniert und als Zell-Linien etabliert, die nur noch das SSV-Genom aber keine Anteile des Helfervirus enthalten und daher keine Viruspartikel freisetzen (sogenannte "Non producer" = NP-Zellen; Aaronson et al., 1975; Bergholz et al., 1977). Außerdem wurden das SSV- und das SSAV-Genom getrennt voneinander in λ -charon Vektoren kloniert (Robbins et al., 1981; Gelmann et al., 1981).

Durch die getrennte Klonierung konnte nachgewiesen werden, daß das SSAV-Genom eine Länge von 9 Kilobasen hat und daß die Gene in der Reihenfolge 5'-gag - pol - env - 3' angeordnet sind. Im Vergleich dazu hat das SSV-Genom Deletionen, die Teile der gag- und pol-Region sowie den größten Teil der env-Region betreffen (Gelmann et al., 1982). In dieser Region, nahe dem 3'Ende, findet sich im SSV-Genom eine Substitution mit einer Länge von ungefähr 1.1 Kilobasen, die als das Onkogen des SSV identifiziert und als v-sis bezeichnet wurde (Gelmann et al., 1982). Die Nukleinsäuresequenz des Onkogens v-sis wurde inzwischen bestimmt (Devare et al., 1982).

Eine dem v-sis weitgehend homologe Nukleinsäuresequenz (i.e. c-sis) konnte auch im Genom von normalen, nicht transformierten Zellen zahlreicher Säugetiere und des Menschen gefunden werden (Wong-Staal et al., 1981;

Dalla Favera et al., 1981). Ähnliches ist auch für die Onkogene anderer Oncorna-Viren beschrieben (vgl. 2.1).

Die Analyse der Nukleinsäuresequenz des sis-Gens zeigte eine sehr große Ähnlichkeit zu dem zellulären Gen, das für den Thrombozyten-abhängigen Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor; PDGF) kodiert (Waterfield et al., 1983; Doolittle et al., 1983). Möglicherweise entspricht also dieser PDGF dem Genprodukt des sis-Gens. Damit wäre zum ersten Mal die normale Funktion des Genprodukts eines Onkogens in der Wirtszelle geklärt.

Durch Hybridisierung der sis-Sequenzen des klonierten SSV-Genoms mit zellulärer DNS verschiedener Spezies konnte gezeigt werden, daß die engste Verwandtschaft zum sis bei der DNS des Wolläffchens besteht (Wong-Staal et al., 1981; Robbins et al., 1982). Vermutlich stammt das SSV also aus der Rekombination der integrierten Provirus-Sequenz des Helfervirus SSAV mit der c-sis-Sequenz des Wolläffchens. Das sis ist das einzige bisher bekannte Onkogen eines Primaten.

Die Expression SSV-spezifischer Proteine in der transformierten Zelle wurde von verschiedenen Forschergruppen untersucht. Für die Untersuchungen wurden Zellen selektioniert, die nur das SSV-Genom enthalten, jedoch keine Partikel produzieren (NP-Zellen, vgl. 2.2.). Man fand, daß in diesen NP-Zellen geringe Mengen von gag-Proteinen des SSAV vorhanden sind (Thiel et al., 1981a; 1982). Dagegen wurden Hüllproteine des SSAV in den NP-Zellen niemals gefunden, was auch mit dem Nachweis einer weitgehenden Deletion des env-Gens (s.o.) überein-

stimmt. Außerdem wurde in den NP-Zellen, nicht jedoch in SSAV-infizierten Zellen, ein Protein von 20000 d und ein Glykoprotein von ungefähr 200000 d nachgewiesen (Thiel et al., 1981b; 1981c). Von einer anderen Forschergruppe wurde in SSV-infizierten NP-Zellen, nicht jedoch in SSAV-infizierten Zellen, ein Phosphoprotein von 115000d gefunden, das eine Protein-Kinase-Aktivität besitzt und Tyrosin-Reste phosphoryliert (Born et al., 1982). Möglicherweise handelt es sich bei diesem Protein um das primäre Translationsprodukt des SSV-Genoms, das als ein Fusionsprotein Teile der gag- und pol-Sequenz sowie die sis-Sequenz enthält. Dieses Fusionsprotein könnte nach der Translation durch eine Protease gespalten werden, wobei das eigentliche Genprodukt des sis-Gens frei wird. Bei Verwendung eines Antiserums, das gegen Teile der Aminosäuresequenz des sis-Genprodukts gerichtet ist, konnte Robbins in der SSV-infizierten Zelle ein Protein von 28000 d nachweisen, das möglicherweise dem sis-Genprodukt entspricht (Robbins et al., 1982).

Genauer ist über die Strukturproteine des SSAV bekannt. Sie weisen eine Ähnlichkeit zu den Strukturproteinen anderer C-Typ Partikel, insbesondere zum Mäuse-Leukämie-Virus auf (Deinhardt et al., 1978; 1980; Aaronson et al., 1976).

Die Reverse Transkriptase des SSAV, das Genprodukt des pol-Gens, ist immunologisch verwandt mit den Polymerasen anderer C-Typ Partikel. Die größte Ähnlichkeit besteht zum Leukämie-Virus des Gibbon (GaLV; Scolnik et al., 1972)

Das Genprodukt des env-Gens sind die Glykoproteine der äußeren Hülle. Beim SSAV sind das die drei Proteine gp70, p15E und p12E. Als gemeinsames Vorstufen-Protein

der drei Glykoproteine wurde ein Protein von 80000 d beschrieben (pr80 env; Bergholz, 1981).

Das gag-Gen der Retroviren kodiert für die Strukturproteine, die das Nukleokapsid des Virus bilden. Diese gag-Proteine werden beim SSAV entsprechend dem Mäuse-Leukämie-Virus als p30, p15, p12 und p10 bezeichnet. Als gemeinsames Vorstufen-Protein der gag-Proteine wurde ein Protein von ungefähr 65000 d, das sogenannte pr65, beschrieben (Bergholz, 1981).

Eine genaue Untersuchung der genannten Proteine des SSV und SSAV, ihrer Synthese und Reifung bis zur Freisetzung der Viruspartikel war das Ziel der vorliegenden Arbeit.

2.3. Synthese und Reifung der Strukturproteine bei RNS-Tumroviren

Die Proteine vieler Viruspartikel, darunter auch der Retroviren, werden nicht direkt in ihrer endgültigen Form synthetisiert, sondern müssen zunächst einen Reifungszyklus durchlaufen. Am besten untersucht ist dieser Zyklus für das Polio-Virus, bei dem zunächst großmolekulare Vorstufen-Proteine synthetisiert werden, die dann teilweise durch zelluläre, insbesondere aber durch virale Proteasen in die Strukturproteine des Virus zerschnitten werden (Jacobson und Baltimore, 1968; Summers und Maizel, 1968; Korant, 1973; Hanecack et al., 1982). Ein ähnlicher Vorgang ist u.a. auch für andere Enteroviren (Holland und Kiehn, 1968), für Arboviren (Burrell et al., 1970) und für das Sindbis Virus (Schlesinger und

Schlesinger, 1972) beschrieben. Auch bei verschiedenen Retroviren wurde ein derartiger Reifungszyklus gefunden (Vogt et al., 1975; Naso et al., 1975). Wie bereits erwähnt, kodieren bei den Retroviren die drei Strukturgene gag, pol und env für großmolekulare Vorstufen-Proteine, die dann sukzessive in die Strukturproteine des Virus zerschnitten werden. Dieser Vorgang wird als Spaltungsreifung bezeichnet, denn bei der proteolytischen Spaltung der Vorstufen entstehen die endgültigen Virusproteine, die dann zusammen mit der RNS das reife Virus bilden. Am besten untersucht ist die Spaltungsreifung bei den gag-Proteinen des Rous-Sarkom-Virus (RSV) der Hühner, die im folgenden als Modell dienen soll.

Die vier Kapsid-Proteine des nicht replikationsdefekten RSV, die als p27, p19, p15 und p12 bezeichnet werden, werden in der infizierten Zelle als Vorstufen-Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 76000 d (pr76) synthetisiert (Vogt und Eisenmann, 1973). Das pr76 wird dann in die endgültigen Kapsid-Proteine gespalten (Vogt et al., 1975; Eisenmann et al., 1975). Das für die Spaltung des Vorstufen-Proteins verantwortliche proteolytische Agens wurde als eines der vier Spaltprodukte identifiziert. Es handelt sich um das Kapsid-Protein p15 (von der Helm, 1977). Ursprünglich wurde die Spaltungsaktivität des p15 durch Isolierung des Proteins aus gereinigten Viruspartikeln entdeckt. Inzwischen konnte durch molekulare Klonierung des Strukturgens, das für p15 kodiert, zweifelsfrei nachgewiesen werden, daß es sich beim p15 tatsächlich um die gesuchte Protease handelt. Das bei der molekularen Klonierung exprimierte p15 besitzt dieselbe proteolytische Aktivität wie das

aus den Viruspartikeln isolierte (Coffin, 1983; persönliche Mitteilung).

Für die ersten Studien zur proteolytischen Aktivität des p15 wurde pr76, das durch in vitro-Translation der RNS des RSV synthetisiert worden war (von der Helm und Duesberg, 1975), als Substrat verwendet. In der Folge wurde gezeigt, daß das p15 auch in der infizierten Zelle, in vivo wirksam ist. Für diese Experimente wurden mit dem RSV infizierte Säugetierzellen verwendet. In diesen Zellen werden geringe Mengen des Vorstufen-Proteins pr76 zwar synthetisiert, jedoch nicht gespalten (Svoboda et al., 1976). Es entstehen also keine Kapsid-Proteine und daher auch keine Viruspartikel. Mit Hilfe einer Mikroinjektionsmethode wurde in einer Serie von Experimenten p15 in diese Zellen injiziert. Anschließend konnte nachgewiesen werden, daß in der Zelle das pr76 in die Kapsid-Proteine gespalten wird (von der Helm et al., 1980). Unter besonderen Umständen wurde sogar die Freisetzung infektiöser, transformierender Viruspartikel induziert (Frixen et al., 1982)

Die Spaltung des pr76 mit p15-Protease kann durch Inkubation mit bestimmten Oligopeptiden, die eine identische oder ähnliche Aminosäuresequenz haben wie die Spaltungsstellen des pr76, weitgehend blockiert werden (von der Helm, 1983). Diese Oligopeptide könnten eine Möglichkeit bieten, spezifisch die Spaltung des Vorstufen-Proteins und damit die Freisetzung transformierender Viruspartikel zu verhindern ohne der Wirtszelle zu schaden.

Außer beim RSV wurden auch bei anderen Retroviren der Geflügel und Säugetiere entsprechende Vorstufen der

Kapsid-Proteine gefunden. Unter anderem gilt das für die Mäuse-Leukämie-Viren (Arcement et al., 1976; van Zaane et al., 1975), das Katzen-Sarkom-Virus (Khan und Stephenson, 1977) und das Affen-Sarkom-Virus SSV/SSAV (Bergholz, 1981). Die Vorstufen-Proteine des Katzen-Sarkom-Virus und des Affen-Sarkom-Virus konnten ebenfalls mit p15-Protease gespalten werden (Khan und Stephenson, 1981; Konze-Thomas und von der Helm, 1981). Jedoch wurde bei diesen Viren bisher keine eigene proteolytische Aktivität gefunden.

Bei den Säugetier-Retroviren ist die Spaltung des Vorstufen-Proteins am besten für das Mäuse-Leukämie-Virus beschrieben. Bei diesem Virus wird ein Vorstufen-Protein pr65 synthetisiert, das in die vier Strukturproteine des Nukleokapsids gespalten wird (van Zaane et al., 1976). Der proteolytische Faktor, der diese Spaltung des Vorstufen-Proteins induziert, wurde in gereinigten Viruspartikeln nachgewiesen (Yoshinaka und Luftig, 1977b; 1977c). Dieser proteolytische Faktor konnte im Gegensatz zum p15 des RSV noch nicht mit einem Strukturprotein des Virus identifiziert werden (Yoshinaka und Luftig, 1980). Fehlt der proteolytische Faktor, so wird in der Wirtszelle das pr65 gebildet, jedoch nicht gespalten. Das wurde für Zellen beschrieben, die mit einem defekten Mäuse-Leukämie-Virus (Collins und Chesebro, 1981) oder mit dem Mäuse-Sarkom-Virus (Pinter und de Harven, 1979) infiziert waren. Durch Zugabe des proteolytischen Faktors konnte auch das pr65 dieser defekten Viren gespalten werden (Yoshinaka und Luftig, 1982). Der proteolytische Faktor ist also essentiell für die Reifung der Strukturproteine des Virus.

Außer beim Mäuse-Leukämie-Virus und beim RSV wurde auch beim Mamma-Tumorvirus der Maus ein ähnlicher proteolytischer Faktor beschrieben (Sen et al., 1980). Möglicherweise ist es also typisch für Retroviren, daß der die Spaltungsreifung der Strukturproteine induzierende proteolytische Faktor mit den Viruspartikeln assoziiert ist. Es werden jedoch noch weitere Untersuchungen der Spaltungsreifung bei anderen Tumoviren benötigt, um diesen Vorgang besser zu verstehen und damit zu beeinflussen.

In der vorliegenden Untersuchung wird die Spaltungsreifung der Vorstufen-Proteine beim Affen-Sarkom-Virus SSV/SSAV analysiert. Wie bereits erwähnt, wird auch bei diesem Virus eine Vorstufe der Kapsid-Proteine, das pr65, synthetisiert. Das pr65 wird in der Wirtszelle in die Kapsid-Proteine gespalten und kann in vitro mit p15-Protease gespalten werden.

In dieser Arbeit wird zum einen die Spaltungsreifung in vivo und die in vitro-Spaltung mit p15-Protease genauer charakterisiert, zum anderen die Frage untersucht, ob auch beim SSV/SSAV ein proteolytischer Faktor mit den Viruspartikeln assoziiert ist. Durch die vergleichende Darstellung der verschiedenen Spaltungsansätze sollte es möglich werden, ein Modell der Spaltungsreifung der Kapsid-Proteine beim SSV/SSAV zu erstellen. Eine genaue Kenntnis der Spaltungsreifung sollte es ermöglichen, spezifische Inhibitoren dieser Reifung zu finden, die keinen Einfluß auf die Wirtszelle haben. Damit wäre die Voraussetzung dafür geschaffen, die Reifung und Freisetzung transformierender Viruspartikel beim Primaten-Sarkom-Virus und in der Folge eventuell auch beim menschlichen Tumovirus spezifisch zu blockieren.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1. Zellen

Für die Gewebekulturversuche und die Vermehrung der Viren wurden verschiedene Zell-Linien von Marmoset- und Rattenzellen verwendet.

Als uninfizierte Kontrollzellen dienten HF-Fibroblasten (Diploide Fibroblasten-Zell-Linie aus der Hautbiopsie eines vier Monate alten Marmoset; Deinhardt et al., 1978), MFS-4 Zellen (MFS-4 = marmoset fetal skin cell line 4) und Nierenzellen der Ratte (NRK = normal rat kidney). Zur Virusvermehrung verwendeten wir vier verschiedene Zell-Linien SSV/SSAV-infizierter Marmosetzellen, die SSV/SSAV-Pseudotyp sowie einen 10-100fachen Überschuß an SSAV produzieren. Dies waren: SSV/SSAV-infizierte HF-Zellen (Deinhardt et al., 1978), sowie Zellen aus drei Fokusklonen SSV/SSAV-infizierter MFS-4 Zellen, die als "2g", "2d" und "Chicago" bezeichnet wurden (Born, 1981). Nicht transformierendes Helfervirus SSAV wurde in NRK-Zellen gezüchtet. Dr. C.M. Bergholz, Urbana Illinois, stellte uns die SSV-transformierte, keine Viruspartikel produzierende Zell-Linie HF-SSV/NP (NP = Non producer, vgl. 2.2.) zur Verfügung (Bergholz et al., 1977).

3.2. Gewebekulturtechniken

3.2.1. Kultivierung der Zellen auf Petrischalen

Zellkulturen wurden in Plastikpetrischalen der Firma Nunc, Dänemark, angelegt. Als Nährmedium zum Züchten der Zellen diente DMEM (Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium, Gibco) mit einem Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FKS; Seromed, 30 Minuten bei 56 °C inaktiviert), 5% NaHCO₃ sowie 100 Einheiten/ml Penicillin (Hoechst) und 100 µg/ml Streptomycin (Hoechst). Dem Nährmedium für transformierte Zellen wurde 0.5% DMSO (Merck) zugesetzt. Die Zellkulturen wurden in einem Heraeus Brutschrank bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und mehr als 90% relativer Luftfeuchte gehalten.

Subkulturen wurden angelegt, nachdem die Zellen der vorangegangenen Passage zu einem dichten Zellrasen ausgewachsen waren. Die Zellen wurden zweimal mit PBS-Lösung (0.1 M Phosphat gepufferte 0.89-prozentige NaCl-Lösung, pH 7.2) gewaschen und anschließend 2 Minuten trypsinisiert (0.25% Trypsin in PBS-Lösung). Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von 10 ml Nährmedium mit einem Zusatz von 10% FKS gestoppt und die Zellen in einer Menge von $1-3 \times 10^6$ Zellen pro Petrischale (Durchmesser 9 cm) neu ausgesät.

3.2.2. Kultivierung der Zellen auf Rollflaschen

Um eine ausreichende Virusvermehrung zu gewährleisten, wurden SSV/SSAV-Partikel produzierende Zellen auf Roll-

flaschen angezüchtet.

Die Zellen wurden auf Petrischalen kultiviert bis sie zu einem dichten Zellrasen ausgewachsen waren. Dann wurden 10 Petrischalen ($\varnothing$ 9 cm) zu je 1×10^7 Zellen 2 Minuten trypsinisiert (vgl. 3.2.1.) und auf eine Borosilikat-Rollflasche der Firma Bellco mit einer Wachstumsfläche von 1330 cm^2 ausgesät. Nach Zugabe von 20 ml Nährmedium wurden die Zellen bei 37°C und einer konstanten Rollgeschwindigkeit von 0.5 Umdrehungen pro Minute in einem Inkubator der Firma Marietta Scientific kultiviert. 3 Tage nach Aussaat wurde das Nährmedium erstmals gewechselt, 6 Tage nach Aussaat wurde begonnen, die Nährmediumüberstände mit dem freigesetzten Virus zu sammeln.

3.2.3. Überinfizierung . SSV-transformierter, keine Partikel produzierender Zellen mit dem Helfer-virus SSAV ("rescue")

Um das Vorhandensein des für die Transformation verantwortlichen SSV-Genoms in SSV-transformierten, keine Partikel produzierenden Zellen (NP-Zellen, vgl. 2.2; 3.1.) nachzuweisen, wurden NP-Zellen mit nicht transformierendem Helfervirus SSAV überinfiziert, sodaß SSV/SSAV-Pseudotypen gebildet werden konnten. Die Überinfektion wurde nach der Methode von Bergholz durchgeführt (Bergholz et al., 1977).

Je 1×10^6 NP-Zellen wurden auf Petrischalen ($\varnothing$ 9 cm) ausgesät und 6 Stunden nach Aussaat mit 5 ml zellfreiem Mediumüberstand SSAV-Partikel produzierender NRK-Zellen überinfiziert. 2 und 5 Tage nach Inokulation wurden die Zellen passagiert, 10 Tage nach Inokulation wurde der

Mediumüberstand der entstandenen NP-rescue-Zellen auf den Gehalt an transformierendem Virus untersucht (vgl. 3.3.).

3.3. Nachweis der Virusvermehrung

3.3.1. Polymerasetest

In den zellfreien Mediumüberständen verschiedener Zell-Linien wurde die Aktivität des Enzyms Reverse Transkriptase untersucht, das für die Familie der Retroviren typisch ist (vgl. 2.1.). Es kam ein Polymerasetest nach Bergholz zur Anwendung (Bergholz et al., 1977). Dabei wird die RNS der Viruspartikel in eine komplementäre DNS umgeschrieben. Als Starter für die Synthese der DNS-Kopie diente entweder poly rA x oligo dT oder poly dA x oligo dT. Die Reverse Transkriptase ist in der Lage, Ribonukleotide wie poly rA als Starter zu verwenden, wohingegen zelluläre DNS-Polymerasen nur Desoxyribonukleotide wie poly dA verwerten können. Das errechenbare Verhältnis rA : dA gibt also Auskunft über die Aktivität der Reversen Transkriptase.

Zellfreie Mediumüberstände verschiedener Zell-Linien wurden pelletiert (vgl. 3.4.1.), die Pellets in je 50 µl Probenpuffer (0.02M Tris-HCl, pH 8,1 (Merck), 0.1% Triton X-100 (Serva)) resuspendiert und 10 Minuten bei 4 °C inkubiert.

Anschließend wurden die Proben halbiert und je 25 µl mit 200 µl der folgenden Reaktionsmischung versetzt: 0.03 M Tris-HCl, pH 8.1, 2 mM DTT (Dithiolthreitol, Serva),

0.06 M KCl, 1 mM MnCl_2 , 25 $\mu\text{l/ml}$ poly rA x oligo dT bzw. poly dA x oligo dT und 40 μCi $^3\text{HdTTP}$ (42 Ci/mmol, Amersham).

Die Inkubation dauerte 45 Minuten bei 37 °C, anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.5 ml kalter 10-prozentiger Trichloressigsäure (TCA, Merck) gestoppt. Die Proben wurden auf Whatman Glasfaserfilter pipettiert und mit TCA gefällt (vgl. 3.8.1.). Die Radioaktivität der getrockneten Filter wurde bestimmt und das Verhältnis rA : dA der TCA-fällbaren counts berechnet. Ein Verhältnis >2 wurde als positive Reverse Transkriptase-Aktivität gewertet.

3.3.2. Fokustest

Zum Nachweis der Produktion transformierender Viruspartikel in den verschiedenen Zellen wurde der Fokustest nach den Vorschriften von Wolfe durchgeführt (Wolfe et al., 1972).

Je 1×10^6 uninfizierte MFS-4- bzw. NRK-Zellen wurden auf Petrischalen ($\varnothing$ 5 cm) ausgesät, 2 Stunden mit je 4 ml Nährmedium bei 37 °C inkubiert und anschließend in einer logarithmischen Verdünnungsreihe mit je 1 ml zellfreier Visussuspension infiziert. Nach 18 Stunden wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen mit je 4 ml eines 0.6-prozentigen Agarosegels überschichtet. Das Agarosegel bestand aus 5 Teilen 2-fach konzentriertem DMEM mit einem Zusatz von 15% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, Antibiotika in den oben angegebenen Konzentrationen (vgl. 3.2.1.) und 2.5% NaHCO_3 , aus 2

Teilen H_2O und aus 3 Teilen 1.8-prozentiger Agarose (Sigma). Nach 14 Tagen Inkubation bei 37 °C wurden die entstandenen transformierten Zellherde (Foci) gezählt. Das Überschichten mit einem Agarosegel diente zur Verhinderung einer Sekundärinfektion.

3.4. Darstellung zellfreier Viruspartikel

3.4.1. Pelletierung der Partikel

Das Nährmedium der Viruspartikel produzierenden Zellen wurde in Abständen von 12-48 Stunden gewechselt. Die gesammelten Mediumüberstände wurden 5 Minuten bei 5000 x g in einer Sorvall-Kühlzentrifuge RC 5B, Rotor SS 34 bei 4 °C zentrifugiert, um sie so von zellulären Verunreinigungen zu befreien. Dem Überstand wurde 0.01 M 2-Mercaptoäthanol zugesetzt, um Desintegration der Viruspartikel zu verhindern.

Die Viruspartikel wurden aus diesem Überstand durch 12-stündige Zentrifugation im GS 3 Rotor der Sorvall-Kühlzentrifuge bei 11600 x g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet 10 Minuten bei 11600 x g und 4 °C rezentrifugiert und der dabei entstandene Überstand wiederum verworfen. Das Pellet wurde in TNE-Puffer (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA) auf eine physikalische Dichte von 1.07 g/cm³ verdünnt und bei 0 °C gelagert. Diese Suspension wird im folgenden als Viruskonzentrat bezeichnet.

3.4.2. Reinigung der Partikel durch Dichtegradientenzentrifugation

In Beckman Nitrocellulose Zentrifugationsröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 38.5 ml wurden 20 - 60-prozentige lineare Sucroседichtegradienten gemischt: 9 ml 60% Sucrose (Merck) in TNE Puffer (vgl. 3.4.1.) wurden mit 9 ml 20% Sucrose in TNE-Puffer zu einem linearen Dichtegradienten gemischt und mit 2 ml 20% Sucrose überschichtet. Das Viruskonzentrat wurde auf den Gradienten aufgetragen und das Röhrchen mit TNE-Puffer aufgefüllt. Die Gradienten wurden 18 Stunden in einer Beckman Ultrazentrifuge L-65, Rotor SW 27 bei 45000 x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend mit einer Schlauchpumpe vom Boden her abgepumpt und in Portionen zu je 1 ml aufgeteilt. Die einzelnen Fraktionen wurden durch Refraktometrie auf ihre physikalische Dichte untersucht. Jeder Fraktion wurde ein Aliquot von 50 µl entnommen, 1:10 mit 0.5% SDS (Serva) verdünnt und die Extinktion bei 280 nm in einem Beckman Spectrophotometer in Quarzglasküvetten gemessen. Aus der Extinktion bei 280 nm wurde anschließend die Proteinkonzentration berechnet (vgl. 3.8.4.). Die Fraktionen mit einer Dichte zwischen 1.13 g/cm³ und 1.18 g/cm³ wurden vereinigt, mit TNE-Puffer auf eine Dichte von 1.07 g/cm³ verdünnt und zur Weiterreinigung erneut auf einen 20 - 60-prozentigen Sucroседichtegradienten aufgetragen. Nach 18 Stunden Zentrifugation im SW 27-Rotor der Ultrazentrifuge bei 45000 x g und 4 °C wurden wiederum Fraktionen zu 1 ml gesammelt. Es wurde erneut die Dichte bestimmt und die Extinktion bei 280 nm gemessen. Die Fraktionen mit einer Dichte von 1.15 - 1.17 g/cm³ wurden vereinigt.

3.4.3. Präparation der gereinigten Viruspartikel

In einem Beckman Polyäthylen Zentrifugationsröhrchen wurde ein Kissen von 0.4 ml 85 % Glycerin (Merck) in TNE-Puffer (vgl. 3.4.1.) mit 2 ml 35 % Glycerin überschichtet. Darüber wurden die durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigten Viruspartikel überschichtet und das Röhrchen mit TNE-Puffer aufgefüllt. Anschließend wurde 1 Stunde bei 175000 x g und 4 °C im SW 41-Rotor der Beckman Ultrazentrifuge zentrifugiert. Dabei wurden die Viruspartikel in das Glycerin-Kissen pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Glycerin-Kissen 48 Stunden gegen 600 ml 0.05 M BES-Puffer (Sigma), pH 6.5, 0.01 M NaCl bei 4 °C dialysiert. Die dialysierte Virussuspension wurde bei 0 °C gelagert.

Die Ausbeute der Präparation betrug durchschnittlich 0.8 mg Gesamtmasse an Virusprotein pro Liter eingesetzten Mediumüberstandes.

3.5. Radioaktive Markierung der Zellen und Viruspartikel

3.5.1. Markierung der Zellen mit ^{35}S -Methionin

Die Zellen wurden 24 Stunden vor Beginn der Markierung in einer Menge von 3×10^6 Zellen pro Petrischale (Ø 9 cm) ausgesät. Die Kulturen befanden sich während der Markierung in der Wachstumsphase, sodaß ein optimaler Einbau der Radioaktivität gewährleistet war.

Uninfizierte und Viruspartikel produzierende Zellen

wurden dreimal mit PBS-Lösung gewaschen und 1 Stunde mit 4 ml Earle's physiologischer Salzlösung in der Modifikation nach Parker bei 37 °C vorinkubiert. SSV-transformierte, keine Partikel produzierende NP-Zellen wurden ebenfalls dreimal gewaschen und anschließend 1 Stunde mit 4 ml Methionin-freiem Eagle's Medium (MEM) mit einem Zusatz von 2.5 % hitzeinaktiviertem, gegen PBS dialysiertem fötalem Kälberserum, 5 % NaHCO₃ und 0.5 % Glucose bei 37 °C vorinkubiert.

Nach Abschluß der Vorinkubation wurde allen Zellen 50 µCi/ml ³⁵S-Methionin zugesetzt (spezifische Aktivität: 1100-1400 Ci/mmol in 20 mM Kaliumacetat, 0.1 % 2-Mercaptoäthanol; Amersham). Zur Puls-Markierung wurden die Zellen 15 Minuten - 2 Stunden bei 37 °C inkubiert (siehe Resultate).

Sollte die Spaltungsreifung der Proteine untersucht werden, so wurden die Zellen im Anschluß an die Puls-Markierung einem "chase" von 1-24 Stunden Dauer unterzogen (vgl. 4.3.2.). Dabei wurden die Zellen nach abgeschlossener Markierung dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 8 ml normales Nährmedium mit einem Zusatz von 1 mM Methionin zugefügt.

3.5.2. Darstellung ³⁵S-Methionin bzw. ³H-Uridin markierter zellfreier Viruspartikel

³⁵S-Methionin Markierung

Viruspartikel produzierende Zellen wurden 24 Stunden vor Beginn der Markierung in einer Menge von 3×10^6 Zellen pro Petrischale (Ø 9 cm) ausgesät. Vor Zugabe der

Radioaktivität wurden die Kulturen dreimal mit PBS gewaschen und 1 Stunde mit 4 ml Earle's physiologischer Salzlösung mit einem Zusatz von 2.5% hitzeinaktiviertem, gegen PBS dialysiertem fötalem Kälberserum sowie 5% NaHCO_3 bei 37 °C vorinkubiert. Dann wurden 50 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S -Methionin (vgl. 3.5.1.) zugefügt. Nach 90 Minuten wurde die Markierung beendet, der radioaktive Überstand gesammelt und 3 ml frisches Nährmedium pro Petrischale zugefügt. Das Medium wurde dreimal in zweistündigen Abständen gewechselt und die Mediumüberstände wurden gesammelt.

Die gesammelten Mediumüberstände wurden 5 Minuten bei 5000 x g und 4 °C geklärt (Sorvall-Kühlzentrifuge, Rotor SS 34). Der geklärte Mediumüberstand wurde mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung, pH 7.0 gefällt (vgl. 3.8.1.). Das Präzipitat wurde 10 Minuten bei 15000 x g und 4 °C pelletiert, in TNE-Puffer (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA) resuspendiert und durch Dichtegradientenzentrifugation über einen 20 - 60-prozentigen Sucroседichtegradienten gereinigt (vgl. 3.4.2)

Dichte und Radioaktivität der einzelnen Fraktionen des Gradienten wurden gemessen (vgl. 3.8.3.) und die Fraktionen, die radioaktiv markiertes Virus enthielten, wurden vereinigt.

^3H -Uridin Markierung

Der Einbau von ^3H -Uridin in Viruspartikel wurde bei SSV/SSAV-infizierten HF-Zellen und bei SSV-transformierten NP-Zellen untersucht. Es wurde ein modifiziertes Verfahren nach Bergholz angewendet (Bergholz et al., 1977).

Je 1×10^6 Zellen in einer Petrischale ($\varnothing$ 9 cm) wurden dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden je 4 ml DMEM mit einem Zusatz von 2.5% hitzeinaktiviertem, gegen PBS dialysiertem fötalem Kälberserum, 5% NaHCO_3 und 0.5% Glucose zugefügt und 16 Stunden mit $50 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Uridin markiert (42 Ci/ml, Amersham). Der radioaktive Überstand wurde nach der Markierung verworfen. Die markierten Zellkulturen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend wurde 4 ml frisches Nährmedium pro Petrischale zugegeben. Das Nährmedium wurde dreimal in dreistündigen Abständen gewechselt und die Überstände vereinigt.

Die gesammelten Mediumüberstände wurden, wie bei der ^{35}S -Markierung beschrieben, aufgearbeitet, durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigt und auf ihre Dichte und Radioaktivität untersucht.

3.6. Isolierung definierter Proteine

3.6.1. Isolierung von Proteinen durch Immunpräzipitation

3.6.1.1. Antiseren

Die verwendeten Antiseren sind in Tabelle 1 aufgeführt. Prof. Dr. F. Deinhardt stellte die Antiseren α -SSV, α -gp 70, α - "pI 28" und α - p 30 zur Verfügung. Ihre Präparation ist beschrieben in Deinhardt et al. (1978).

Tabelle 1

Antiseren

Serum	Ursprung	Spezifität	eingesetzte Menge
normal goat	Ziege	Kontrollserum	5 µl
α- p 30	Ziege	<u>gag</u> -Proteine	6 µl
α- gp 70	Ziege	Virus-Hüllproteine	8 µl
α- "pI 28"	Ziege	Virus-Hüllproteine	8 µl
α- SSV	Ziege	Antiserum gegen die Proteine SSV/SSAV-infizierter und transformierter Ziegenzellen	10 µl

Es wurden die in der Tabelle angegebenen Mengen an Antiserum eingesetzt, um vergleichbare virale Proteinmengen im Immunpräzipitat zu erhalten.

3.6.1.2. Immunpräzipitation intrazellulärer SSV/SSAV-spezifischer Antigene

Radioaktiv markierte Zellen (vgl. 3.5.1.) wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 0.5 - 1 ml Lysispuffer (0.01 M Tris-HCL, pH 7.6, 0.05 M NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.5% Natriumdesoxycholat (Merck), 0.1% SDS mit einem Zusatz des Proteaseninhibitors Aprotinin (100000 KIU/ml, Thiemann) in einer Endkonzentration von 1%) bei 0 °C lysiert. Anschließend wurden in einer Eppendorf Tischzentrifuge 2 Minuten lang gröbere, nicht lysierte Komponenten abzentrifugiert und der Überstand 30 Minu-

ten in einer luftgetriebenen Ultrazentrifuge (Beckman, Airfuge) bei 92000 x g zentrifugiert.

Das Pellet der Ultrazentrifugation wurde verworfen, der Überstand wurde mit 20 µl einer 15-prozentigen Suspension von Sepharose-gebundenem Staphylococcus aureus Protein A (Pharmacia) 15 Minuten bei 4 °C präabsorbiert und 2 Minuten in der Tischzentrifuge abzentrifugiert.

Der Überstand wurde in Aliquots zu 0.1 - 0.5 ml aufgeteilt und mit je 6 - 10 µl Antiserum (vgl. Tabelle 1, 3.6.1.1.) inkubiert. Die Fällungsansätze standen 5 Minuten bei 37 °C und 60 Minuten bei 4 °C.

Danach wurden 20 - 60 µl Protein A-Sepharose zugegeben und 30 Minuten bei 4 °C geschüttelt. Die entstandenen Immunkomplexe wurden durch zweiminütige Zentrifugation in der Tischzentrifuge gewonnen. Dann wurden die Präzipitate zweimal mit je 1 ml einer Lösung von 0.5% Triton X-100, 0.5% DOC in 0.05 M NaCl, 0.01M Tris-HCl, pH 7.6 und anschließend dreimal mit je 1 ml 0.05 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.6 gewaschen und in der Tischzentrifuge pelletiert.

Die gewaschenen Immunkomplexe wurden entweder als Substrat zum Test einer proteolytischen Aktivität verwendet oder nach Elution in Auftragspuffer durch Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (vgl. 3.8.2.).

3.6.1.3. Darstellung viraler Antigene in den Viruspartikeln mittels Immunpräzipitation

Viruspartikel produzierende Zellen wurden, wie in 3.5.2. beschrieben, mit ³⁵S-Methionin markiert und die Mediumüberstände gesammelt.

Die gesammelten radioaktiven Mediumüberstände wurden 5 Minuten bei 5000 x g und 4 °C geklärt (Sorvall Kühlzentrifuge, Rotor SS 34) und anschließend 2 Stunden bei 82700 x g und 4 °C in der Beckman Ultrazentrifuge (Rotor SW 27) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets mit den radioaktiv markierten Viruspartikeln wurden in 2 ml Lysispuffer (vgl. 3.6.1.2.) resuspendiert und 15 Minuten bei 4 °C lysiert. Das Lysat wurde 2 Minuten in der Tischzentrifuge geklärt und 15 Minuten mit 50 µl einer 15-prozentigen Protein A-Sepharose Suspension präabsorbiert.

Die Immunpräzipitation und das Waschen der Immunkomplexe wurde wie in 3.6.1.2. beschrieben durchgeführt.

3.6.2. Fraktionierung der Proteine der Viruspartikel durch Auftrennen über ein Molukularsieb

Um die einzelnen Proteine gereinigter SSV/SSAV-Partikel voneinander getrennt darzustellen, wurden die gereinigten Viruspartikel lysiert und über eine Molekularsieb-Säule, dem Molekulargewicht der jeweiligen Proteine entsprechend, in verschiedene Fraktionen aufgetrennt. Die Methode wurde in Anlehnung an die Reinigung der p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus (von der Helm und Konze-Thomas, 1980) durchgeführt.

Zellfreie Viruspartikel wurden, wie in 3.4. beschrieben, gereinigt und in ein Kissen von 85% Glycerin pelletiert. Die Virussuspension wurde mit 0.6 ml Lysispuffer (5 mM DTT, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 in 0.25 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl, pH 8.8) 15 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert, anschließend 4 x 10 Sekunden mit einem Branson Sonifier (Modell S 75) bei Stufe 5 unter Kühlung mit Ultraschall behandelt, mit festem BES (Bis-hydroxyäthylaminoäthansulfonsäure) auf pH 6.5 eingestellt und 5 Minuten bei 5000 x g und 4 °C geklärt (Sorvall-Kühlzentrifuge, Rotor SS 34).

Der Überstand wurde auf eine p60 - Säule (1.5 x 80 cm, Bio-Gel p60, Bio-Rad, äquilibriert mit Säulenpuffer) aufgetragen. Es wurde mit Säulenpuffer (0.5% Triton X-100, 3 mM DTT, 1 mM EDTA in 0.1 M NaCl, 0.01 M Bis-Tris, pH 6.5) bei einer Flußrate von 5 ml pro Stunde eluiert und das Eluat in Fraktionen zu 1 ml aufgefangen.

Jeder dritten Fraktion wurde ein Aliquot von 0.2 ml entnommen, mit TCA gefällt (vgl. 3.8.1.) und im SDS-Gel analysiert (vgl. 3.8.2.). Jeweils 2 bzw. 3 Fraktionen wurden entsprechend ihrer Proteinzusammensetzung im SDS-Gel vereinigt und mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt (vgl. 3.8.1.). Die Präzipitate wurden in je 0.2 ml 0.05 M BES, pH 6.5, 0.15 M NaCl, 5 mM DTT resuspendiert, 48 Stunden gegen den gleichen Puffer dialysiert und auf proteolytische Aktivität getestet (vgl. 3.7.2.).

3.7. Reaktionsbedingungen der in vitro-Spaltung isolierter SSV/SSAV-spezifischer Proteine

3.7.1. Reaktionsbedingungen der Spaltung mit der p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus

Es wurde versucht, durch Immunpräzipitation isolierte Vorstufen-Proteine des SSV/SSAV mit der p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus wie beschrieben zu spalten (Konze-Thomas und von der Helm, 1981).

Gereinigte p15-Protease wurde von Dr. von der Helm zur Verfügung gestellt. Das Protein war nach der beschriebenen Methode (von der Helm und Konze-Thomas, 1980) isoliert worden und war in 60% Triton X-100, 20% 2-Mercaptoäthanol in 0.02 M BES, pH 6.5 in einer Konzentration von 1 mg Protein/ml suspendiert. SSV/SSAV-Partikel produzierende Zellen wurden mit ^{35}S -Methionin markiert (vgl. 3.5.1.) und immunpräzipitiert (vgl. 3.6.1.2.). Die präzipitierten Immunkomplexe wurden in 50 μl 50 mM BES, pH 6.5 bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (0.01 M, 0.15 M bzw. 0.5 M NaCl) resuspendiert. 1 μl der p15-Stammlösung (s.o.) wurde zugefügt und 1-16 Stunden auf einem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Acetonfällung präzipitiert (vgl. 3.8.1.) und durch Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (vgl. 3.8.2.)

Inhibitoren

Durch Zugabe verschiedener Oligopeptide sollte die Spaltung der Proteine mit p15-Protease inhibiert werden, wie im System des Hühner-Oncorna-Virus beschrieben

(von der Helm, 1983). Zur Anwendung kamen folgende Oligopeptide, jeweils in einer Menge von 100 µg pro Spaltungsansatz:

Oligopeptid A:

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met

Oligopeptid B:

Lys-Phe-Ile-Gly-Leu-Met

Die Oligopeptide wurden in jeweils 20 µl 0.05 M BES, pH 6.5, 0.15 M NaCl 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 1 µl der p15-Stammlösung (s.o.) inkubiert. Anschließend wurde das Protease-Peptid-Gemisch zu den präzipitierten Immunkomplexen gegeben und die weitere Spaltung wie oben beschrieben durchgeführt.

3.7.2. Reaktionsbedingungen der Spaltung mit der SSV/SSAV-assoziierten Protease

Es wurde versucht, durch Immunpräzipitation isolierte Vorstufen-Proteine des SSV/SSAV mittels gereinigter, lysierter SSV/SSAV-Partikel bzw. gereinigter Proteine dieser Partikel zu spalten.

Spaltung durch Zugabe lysierter SSV/SSAV-Partikel

SSV/SSAV-Partikel produzierende HF-Zellen wurden wie beschrieben mit ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert (vgl. 3.5.1.), lysiert und mit dem Antiserum Anti-p30 immunpräzipitiert (vgl. 3.6.1.2.). Die Immunkomplexe wurden

in 30 μ l Spaltungspuffer (0.05 M BES, pH 6.5, 1% Triton X-100, 5 mM DTT bei 0.01 M bzw. 0.15 M NaCl) resuspendiert. Diese Suspension diente als Substrat für die Spaltungsversuche. Als proteolytisches Agens dienten unmarkierte SSV/SSAV-Partikel, die, wie in 3.4. beschrieben, durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigt und 48 Stunden bei 4 °C gegen 600 ml Spaltungspuffer (s.o.) dialysiert waren. Es wurde jeweils eine Gesamtmenge von 150 μ g nicht-markiertem Virusprotein pro Spaltungsansatz eingesetzt. Die Spaltungsansätze wurden 8 bzw. 14 Stunden geschüttelt. Anschließend wurden die Proteine durch Acetonfällung präzipitiert (vgl. 3.8.1.) und durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert (vgl. 3.8.2.).

Spaltung mit isolierten Proteinen des SSV/SSAV

In diesem Spaltungsansatz wurde versucht, radioaktiv markierte, immunpräzipitierte Vorstufen-Proteine des SSV/SSAV (s.o.) durch Zugabe von nicht markierten, aber diesmal über ein Molekularsieb fraktionierten Proteinen des SSV/SSAV (vgl. 3.6.2.) zu spalten. Zu den Immunkomplexen wurden Aliquots der aus dem Molekularsieb eluierten Proteinfractionen gegeben und mit Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1% versetzt. Die Spaltung und die Analyse der Spaltprodukte wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Inhibitoren

Beim Versuch, die SSV/SSAV-assoziierte Spaltung durch Zugabe verschiedener Proteaseinhibitoren zu blockieren, wurde zu den Spaltungsansätzen, die wie oben beschrie-

ben vorbereitet waren, vor Beginn einer der beiden folgenden Proteaseinhibitoren zugefügt

A: PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, Sigma) in einer Endkonzentration von 3 mM

B: PCMB (para-Hydroxymercuribenzoat, Serva) in einer Endkonzentration von 1 mM

Konzentration und Versuchsansatz wurden entsprechend den angegebenen Verfahren gewählt (Dittmar und Mölling, 1978; von der Helm, 1981).

Analog zur Inhibition der Spaltung mit p15-Protease (vgl. 3.7.1.) wurde versucht, die SSV/SSAV-assoziierte Protease durch Zugabe verschiedener Oligopeptide zu inhibieren. Ansatz und Versuchsdurchführung entsprachen den in 3.7.1. angegebenen Verfahren.

3.7.3. Reaktionsbedingungen der Spaltung mit der Protease aus Extrakten von lysierten Zellen

Es wurde versucht, durch Immunpräzipitation isolierte Vorstufen-Proteine des SSV/SSAV durch Zugabe von Extrakten lysierter Zellen zu spalten.

SSV/SSAV-Partikel produzierende Zellen wurden radioaktiv markiert (vgl. 3.5.1.) und immunpräzipitiert (vgl. 3.6.1.2.). Die präzipitierten Immunkomplexe dienten als Substrat für die Spaltung.

Je 5×10^6 Zellen verschiedener Zell-Linien wurden mit 0.25 ml einer Lösung von 1% Triton X-100, 5 mM DTT in 0.05 M BES, pH 6.5, 0.15 M NaCl 15 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend 15 Minuten bei 4 °C lysiert. Danach wurden die Lysate 2 Minuten in der Tischzentrifuge zentrifugiert.

fuge abzentrifugiert. Aliquots von 0.1 ml der resultierenden Überstände wurden zu den vorbereiteten Immunkomplexen gegeben und 8 bzw. 14 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Proteine durch Acetonfällung präzipitiert (vgl. 3.8.1.) und durch Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (vgl. 3.8.2.).

3.8. Analytische Methoden

3.8.1. Quantitative Präzipitation der Gesamtproteine

TCA - Fällung

Zur Analyse der TCA-fällbaren Proteine durch Polyacrylamidgelelektrophorese wurden Aliquots der jeweiligen Proben mit 10% kalter Trichloressigsäure versetzt, 60 Minuten bei 4 °C geschüttelt und 15 Minuten bei 15000 x g und 4 °C abzentrifugiert (Sorvall Kühlzentrifuge, Rotor SS 34). Der Überstand wurde verworfen, die Pellets zweimal in je 5 ml Aceton (Merck) gewaschen und je 10 Minuten bei 15000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets getrocknet, in Auftragspuffer für die Elektrophorese resuspendiert und elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 3.8.2.).

Zur Bestimmung der gesamten TCA-fällbaren ³H-Radioaktivität wurden Aliquots der Proben auf Whatman Glasfaserfilter (GF/c, Ø 2.5 cm) pipettiert, die mit 10% TCA getränkt waren. Die getrockneten Filter wurden dreimal mit kalter, 10-pozentiger TCA und anschließend einmal

mit kaltem, 70-prozentigem Äthanol (Merck) gewaschen. Die Filter wurden unter der Infrarotlampe getrocknet und die Radioaktivität der getrockneten Filter bestimmt (vgl. 3.8.3.).

Acetonfällung

Zur Acetonfällung der Proteine wurden die Proben mit dem 5-fachen Volumen Aceton 60 Minuten bei -20°C inkubiert. Dann wurde in der Tischzentrifuge 10 Minuten abzentrifugiert. Die Pellets wurden zweimal in 0.05 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.6 gewaschen und je 2 Minuten abzentrifugiert. Die gewaschenen Pellets wurden in Auftragspuffer resuspendiert und elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 3.8.2.).

Ammoniumsulfatfällung

Sollten Viruspartikel oder gereinigte Proteine für spätere Spaltungsversuche präzipitiert werden, so wurde die schonendere Ammoniumsulfatfällung verwendet. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (Merck), pH 7.0 versetzt und 60 Minuten bei 0°C gefällt. Anschließend wurde 10 Minuten bei $15000 \times g$ und 4°C im SS 34 Rotor der Sorvall Kühlzentrifuge zentrifugiert und das Pellet für die Spaltung resuspendiert.

Bei Proben mit niedriger Proteinkonzentration wurde Rinderserumalbumin (Serva) in einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ als Trägerprotein zugegeben, um eine quantitative Präzipitation zu gewährleisten.

3.8.2. Elektrophoretische Auftrennung

3.8.2.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde eine diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Es kamen 12.5- und 15-prozentige Acrylamidgele mit einem Anteil von 0.3 bzw. 0.35% Bisacrylamid zur Anwendung. Als Elektrophoresekammer diente ein System aus 2 übereinander angeordneten Elektroden-Kammern, die durch ein zwischen Glasplatten gegossenes und vertikal eingespanntes Gel während der Elektrophorese verbunden waren. Aus folgenden Puffern und Stammlösungen wurden entsprechend Tabelle 2 die jeweiligen Gel-Lösungen gemischt:

Acrylamidlösung	:	30 % Acrylamid (Serva)
		0.7 % Bisacrylamid (Serva)
Tris-Puffer I (Trenngel)	:	0.75 M Tris-HCl, pH 8.8
		0.2 % SDS
Tris-Puffer II (Sammelgel)	:	0.25 M Tris-HCl, pH 6.8
		0.2 % SDS

Tetramethyläthylendiamin (TMED, Serva)

10% Ammoniumperoxidisulfat (APS, Serva)

Tabelle 2

SDS-Polyacrylamidgel

Acrylamidkonzentration		5%	12.5%	15%
Endvolumen	(ml)	15	30	30
Acrylamidlösung	(ml)	2.5	12.5	15
Tris-Puffer I	(ml)	--	15	15
Tris-Puffer II	(ml)	7.5	--	--
H ₂ O	(ml)	5	2.5	--
TMED	(μ l)	10	10	10
Die Lösungen wurden 5 Minuten lang mit einer Wasserstrahlpumpe entgast				
APS	(μ l)	50	100	100

Zum Füllen der Glasplatten (14 x 15.5 cm) wurden diese zunächst mit Abstandshaltern (1.5 mm) an beiden Seiten und am Boden aneinandergeklemt und mit flüssiger 0.9-prozentiger Agarose (Sigma) abgedichtet. Nach Verfestigung der Agarose wurde das jeweilige Trenngel eingefüllt und nach dessen Polymerisation das 5-prozentige Sammelgel. In das Sammelgel wurde ein die späteren Auftragspalten vorformender Kamm eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden der Kamm sowie der am Boden eingesetzte Abstandshalter entfernt und das zwischen den Glasplatten polymerisierte Gel in die Elektrophorese-Kammer eingespannt. Als Elektrodenpuffer diente eine Lösung von 0.1% SDS und 0.192 M Glycin (Serva) in 0.025 M Tris-HCl, pH 8.2.

Bereits in Lösung befindliche Proben wurden mit 1 Teil 4-fach konzentriertem Auftragspuffer (7% SDS, 30% Glycerin, 20% 2-Mercaptoäthanol in 0.09 M Tris-HCl, pH 6.8) auf 3 Teile Probenlösung versetzt, nicht gelöste Proben

wurden in 1 Teil Auftragspuffer und 3 Teile 0.09 M Tris-HCl, pH 6.8 eluiert. Anschließend wurden die Proben 2 Minuten gekocht und 2 Minuten in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde in die Auftragsspalten eingefüllt und mit Elektrodenpuffer überschichtet.

Referenzproben

Als Marker für die Wanderungsgeschwindigkeit wurden verschiedene Proteinmischungen parallel zu den Proben auf das Gel aufgetragen. Es handelte sich dabei um Phosphorylase b (MW = 94000 d), Rinderserumalbumin (66000 d), Ovalbumin (45000 d) und Cytochrom c (12400d). Außerdem wurde eine Suspension der Strukturproteine p27, p19, p15 und p12 des Hühner-Myeloblastose-Virus (AMV) als Marker verwendet.

Elektrophoresebedingungen

Die Elektrophorese lief bei konstanter Stromstärke von 15 mA, solange sich die Proben im Sammelgel befanden. Hatte das als Marker für die Wanderungsgeschwindigkeit zugemischte Brom-Phenol-Blau (Merck) die Grenzlinie zwischen Sammel- und Trenngel überschritten, wurde auf konstante Stromstärke von 25 mA umgeschaltet. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald das Brom-Phenol-Blau den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte. Das Gel wurde aus den Glasplatten gelöst und die Proteine mit Coomassie-Blau bzw. Silber angefärbt.

Proteinfärbung mit Coomassie-Blau

Die Gele wurden zunächst 5 Minuten in 50% TCA fixiert und anschließend 10 Minuten in Färbelösung (0.4% Coomassie-Blau R 250 (Serva) in 50% TCA) geschüttelt. Dann wurde 18 Stunden in 20% Methanol (Merck), 7% Essigsäure (Merck) unter Schütteln entfärbt.

Proteinfärbung mit Silber

Die Silberfärbung wurde nach der Methode von Oakley (Oakley et al., 1980) modifiziert. Zunächst wurden die Gele 30 Minuten in 50% Methanol, 10% Essigsäure, dann über Nacht in 5% Methanol, 7% Essigsäure geschüttelt. Anschließend wurde 30 Minuten in 10% Glutaraldehyd (Merck) fixiert und 3 Stunden in H_2O bei 8-maligem Wasserwechsel gewaschen. Danach wurde 15 Minuten in Färbelösung geschüttelt (31.5 ml NaOH 0.36% (Merck), 2.1 ml NH_3 (Merck), 6 ml $AgNO_3$ 20% (Merck), ad 150 ml). Überschüssige Färbelösung wurde 5 Minuten in H_2O bei dreimaligem Wasserwechsel ausgewaschen und das Gel 5-10 Minuten entwickelt (10 mg Zitronensäure (Merck), 125 μ l Formalin 37% (Merck), ad 250 ml). Zum Abschluß wurde 2 Stunden bei 5-maligem Wasserwechsel gewässert.

Autoradiographie

Für die Autoradiographie wurden die Gele nach abgeschlossenem Färbevorgang bei 80 °C unter Vakuum getrocknet und einem Kodak NS-2T Röntgenfilm aufgelegt.

3.8.2.2. Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von Harnstoff und Acetatpuffer

Im Gegensatz zum SDS-Gel, bei dem alle Proteine annähernd die gleiche negative Ladung tragen und das demnach in erster Linie nach dem Molekulargewicht der Proteine auftrennt, geht beim Harnstoff-Gel auch die unterschiedliche elektrische Ladung der Proteine in die Wanderungsgeschwindigkeit ein.

Zur Anwendung kamen 13-prozentige Acrylamidgele mit einem Anteil von 0.09% Bisacrylamid. Die Glasplatten und Elektrodenkammern wurden wie in 3.8.2.1. beschrieben vorbereitet. Folgende Puffer und Stammlösungen wurden verwendet:

Acrylamidlösung	: 60% Acrylamid 0.4% Bisacrylamid
Harnstoff-Puffer	: 10 M Harnstoff (Merck) 6.67% Essigsäure, pH 3.5
20% Triton X-100	
Tetramethyläthylendiamin (TMED, Serva)	
10% Ammoniumperoxidisulfat (APS, Serva)	

Zunächst wurden 11 ml Acrylamidlösung, 37 ml Harnstoff-Puffer und 0.25 ml TMED gemischt und 5 Minuten mit einer Wasserstrahlpumpe entgast. 3 ml dieser Lösung wurden entnommen, mit 25 µl APS versetzt und in die vorbereiteten Glasplatten eingefüllt. Diese Lösung diente als Haltegel zum Abdichten der Glasplatten. Nach Polymerisation des Haltegels wurde zum Rest der Gel-Lösung 0.85 ml 20% Triton X-100 zugegeben, erneut entgast und die Lösung mit 200 µl APS versetzt. Diese Lösung wurde zwischen die Glasplatten eingefüllt. Durch einen Kamm wurden die späteren Auftragsspalten vorgeformt.

Das polymerisierte Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt und über Nacht bei konstanter Spannung von 60 Volt einer Prä-Elektrophorese unterzogen. Als Elektrodenpuffer diente 0.9 n Essigsäure, pH 3.5, in die Auftragsspalten wurden je 30 µl einer Lösung aus 3 Teilen Harnstoff-Puffer und 1 Teil 1.68% Triton X-100 eingefüllt.

Die Proben wurden mit 30 µl Auftragspuffer (1 % Triton-X-100, 10% 2-Mercaptoäthanol in 8 M Harnstoff, 5.4% Essigsäure) 30 Minuten bei 4 °C inkubiert und 2 Minuten in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. In die Elektrodenkammern wurde frische 0.9 n Essigsäure eingefüllt und die Proben wurden in die Auftragsspalten unterschichtet.

Die Elektrophorese lief 5 Stunden bei konstanter Spannung von 120 Volt. Danach wurde das Gel aus den Platten gelöst und mit Coomassie-Blau angefärbt. Färbung, Entfärbung, Trocknung und Autoradiographie entsprachen den in 3.8.2.1. angegebenen Verfahren.

3.8.3. Bestimmung der Radioaktivität

Zur Bestimmung der gesamten in die radioaktiv markierten Viruspartikel eingebauten ^3H - bzw. ^{35}S -Radioaktivität wurden Aliquots der gereinigten Virussuspensionen entnommen und im Szintillationszähler gezählt. Es wurden jeweils 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Quickszint 212, Zinsser) zu den Proben gegeben und die Radioaktivität in cpm bestimmt. Die Messung erfolgte in einem Beckman-Flüssigkeits-Szintillationszähler, Modell LS 9000. Zur Bestimmung der gesamten TCA-fällbaren ^3H -Radioakti-

vität wurden die getrockneten Filter mit den radioaktiven Proben (vgl. 3.8.1.) nach Zugabe von 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Econoflour, New England Nuclear) ebenfalls im Beckman LS 9000 Szintillationszähler gezählt.

3.8.4. Proteinbestimmungsmethoden

Die in den Proben enthaltene Proteinmenge wurde nach der von Lowry angegebenen Methode (Lowry et al., 1951) bestimmt.

Der Proteingehalt von Lösungen wurde auch bestimmt durch Messung der Extinktion bei 280 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbieren in erster Linie die aromatischen Aminosäuren. Sie dienen als Meßgröße bei dieser Bestimmungsmethode. Zur Berechnung der Proteinkonzentration der Lösungen wurde die Warburg'sche Formel verwendet:

$1.55 \times \text{OD } 280$ (optische Dichte bei 280 nm Wellenlänge) -
 $0.76 \times \text{OD } 260$ (optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge)
ergibt ungefähre Proteinkonzentration in mg/ml.

4. ERGEBNISSE

4.1. Untersuchungen über die Produktion von infektiösen, transformierenden Viruspartikeln in den Zellen

Verschiedene Linien uninfizierter, SSV-infizierter bzw. SSV/SSAV-infizierter Zellen (vgl. 3.1.) sollen vergleichend bezüglich ihrer Transformiertheit und bezüglich der Produktion von Retroviren untersucht werden. Die in diesem Kapitel charakterisierten Zellen und gereinigten Viruspartikel dienen als Ausgangsmaterial für die folgenden Untersuchungen der Proteine des SSV/SSAV.

4.1.1. Untersuchungen zur Freisetzung von Viruspartikeln aus den Zellen

Zunächst sollte gesichert werden, daß aus SSV/SSAV-infizierten und dadurch transformierten HF-Zellen (vgl. 3.1.) Viruspartikel freigesetzt werden. Dazu wurden zellfreie Mediumüberstände unmarkierter bzw. radioaktiv markierter Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation auf Partikel gereinigt (vgl. 3.4.2.). Anschließend wurde der Proteingehalt der Dichtegradienten-Fractionen durch Messung der Extinktion bei 280 nm (vgl. 3.8.4) bzw. durch Bestimmung der Radioaktivität (vgl. 3.8.3.) analysiert und die physikalische Dichte der Fractionen gemessen.

In Abbildung 1 sind Extinktion bei 280 nm bzw. ^{35}S -Radioaktivität und die physikalische Dichte der Fraktio-

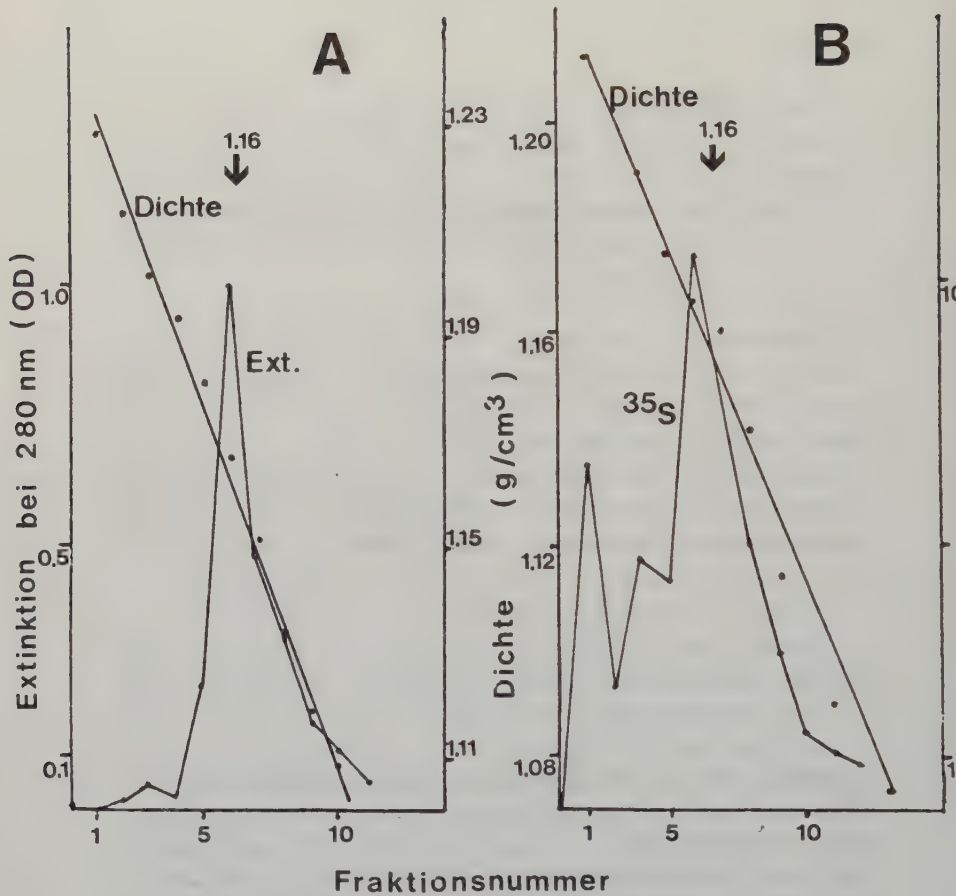


Abbildung 1: Reinigung von unmarkierten bzw. ³⁵S-Methionin markierten Viruspartikeln aus Zellkulturüberständen

Zellkulturüberstände von unmarkierten bzw. mit ³⁵S-Methionin radioaktiv markierten SSV/SSAV-infizierten HF-Zellen wurden abzentrifugiert und auf 20 - 60-prozentige Sucrose-Dichtegradienten aufgetragen. Anschließend wurden die Gradienten 18 Stunden lang bei 45000 x g zentrifugiert und ausgetropft. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihre physikalische Dichte und auf ihre Extinktion bei 280 nm bzw. die eingebaute ³⁵S-Radioaktivität untersucht.

- A Zellkulturüberstände unmarkierter HF-Zellen
 B Zellkulturüberstände ³⁵S-Methionin markierter HF-Zellen

nen aufgetragen. In beiden Versuchen findet sich ein einzelner Aktivitätsgipfel im Bereich einer Dichte von 1.15 g/cm^3 - 1.17 g/cm^3 mit einem Maximum bei 1.165 g/cm^3 .

Die physikalische Dichte der meisten C-Typ Partikel beträgt $1.15 - 1.175 \text{ g/cm}^3$. Für das SSV/SSAV ist allerdings eine geringfügig leichtere Dichte von $1.13 - 1.15 \text{ g/cm}^3$ beschrieben (Fidanian et al., 1975; Jensik et al., 1973). Die folgenden Untersuchungen bezüglich Polymeraseaktivität, Bildung von transformierten Zellfoci, sowie die Charakterisierung der Proteine zeigen jedoch zweifelsfrei, daß die gereinigten Fraktionen mit einer Dichte von 1.165 g/cm^3 tatsächlich transformierende SSV/SSAV Partikel enthalten.

Der Unterschied in der physikalischen Dichte der Viruspartikel deutet wahrscheinlich auf einen höheren Reinigungsgrad der hier dargestellten Präparation gegenüber der in der Referenz zitierten hin. Es ist beschrieben, daß SSV/SSAV-Partikel größere Mengen Serumlipide binden (Toplin und Sottong, 1972), diese gebundenen Lipide verringern vermutlich die physikalische Dichte der Viruspartikel.

Im folgenden wird die Freisetzung von Viruspartikeln aus SSV/SSAV-infizierten HF-Zellen (vgl. 3.1.) mit SSV-infizierten, transformierten Zellen, die jedoch das Helfervirus SSAV nicht enthalten, verglichen. Damit soll untersucht werden, ob diese sogenannten "Non producer"-Zellen (NP-Zellen, vgl. 3.1.) tatsächlich keine Viruspartikel freisetzen. Es wurde mit ^3H -Uridin markiert, das in die RNS eingebaut wird und deshalb beson-

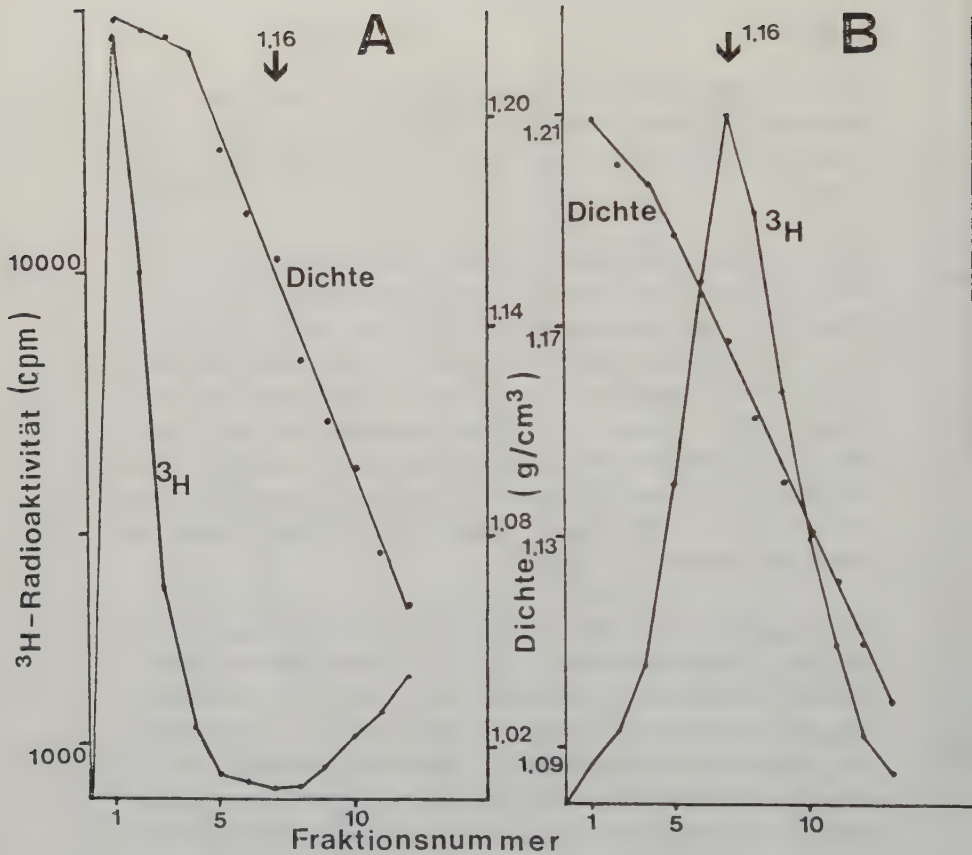


Abbildung 2: Reinigung von ^3H -Uridin markierten Viruspartikeln aus Zellkulturüberständen

SSV/SSAV-infizierte HF-Zellen und SSV-transformierte NP-Zellen wurden jeweils 16 Stunden lang mit ^3H -Uridin radioaktiv markiert. Die Zellkulturüberstände wurden abzentrifugiert und auf 20 - 60-prozentige Sucrose-Dichtegradienten aufgetragen. Anschließend wurden die Gradienten 18 Stunden bei 45000 x g zentrifugiert und ausgetropft. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihre physikalische Dichte und auf die eingebaute ^3H -Radioaktivität untersucht.

- A NP-Zellen
- B HF-Zellen

ders günstig zur Markierung von RNS-Viren ist (vgl. 3.5.2.). Die markierten zellfreien Mediumüberstände wurden durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigt und die physikalische Dichte bzw. ^3H -Aktivität der einzelnen Fraktionen bestimmt.

In Abbildung 2 ist die ^3H -Radioaktivität der einzelnen Fraktionen gegen die physikalische Dichte aufgetragen. Bei den SSV/SSAV infizierten HF-Zellen findet man wiederum das beschriebene Aktivitätsmaximum bei 1.165 g/cm^3 , das den gereinigten SSV/SSAV-Partikeln entspricht. Dagegen werden aus den NP-Zellen keine mit ^3H -Uridin markierbaren Partikel mit einer physikalischen Dichte von ungefähr 1.165 g/cm^3 freigesetzt. Der Aktivitätsgipfel bei 1.22 g/cm^3 ist vermutlich auf eine Verunreinigung mit zellulären Mikrosomen oder Mitochondrien zurückzuführen, die bei der Klärung der Mediumüberstände nicht entfernt werden konnten. Da für Retroviren noch nie eine physikalische Dichte größer als 1.18 g/cm^3 beschrieben wurde, kann man davon ausgehen, daß es sich dabei nicht um Viruspartikel handelt.

Es konnte demnach gezeigt werden, daß die SSV-infizierten NP-Zellen tatsächlich keine Partikel freisetzen, die ihrer physikalischen Dichte nach Retroviren sein könnten.

4.1.2. Untersuchungen zur Polymeraseaktivität in zellfreien Mediumüberständen

Die Freisetzung von Retroviren aus den Zellen sollte für verschiedene Zell-Linien durch Bestimmung der Aktivität

des Enzyms Reverse Transkriptase (RNS-abhängige DNS-Polymerase, vgl. 2.1.) untersucht werden. Der positive Nachweis einer Polymeraseaktivität im zellfreien Mediumüberstand (experimentelle Einzelheiten, vgl. 3.3.1.) ist ein hochspezifisches Zeichen für das Vorhandensein von Retroviren.

Tabelle 3 zeigt das Ergebnis des Polymerasetests für fünf verschiedene Zell-Linien.

Tabelle 3 Polymerasetest

Quotient der TCA-fällbaren cpm rA:dA	
Uninfizierte Kontrolle (HF-Zellen)	0.47
NP-Zellen	0.73
NP-" <u>rescue</u> "-Zellen	2.80
SSV/SSAV-HF-Zellen	8.8
SSAV-infizierte Zellen	10.6

Charakterisierung der Zell-Linien vgl. 3.1.

Ein Quotient >2 der cpm rA:dA wurde als positives Ergebnis des Polymerasetests gewertet (Bergholz, 1977).

Wie erwartet, war der Polymerasetest bei den SSV/SSAV-HF-Zellen und den SSAV-infizierten Zellen positiv. Diese Zellen setzen also Retroviren in den Mediumüberstand frei: HF-Zellen SSV/SSAV-Partikel, die SSAV-infizierten Zellen das Helfervirus SSAV.

Negativ ist der Polymerasetest für die uninfiizierte Kontrolle und für die NP-Zellen. In Übereinstimmung mit 4.1.1. sieht man also, daß die NP-Zellen keine Retroviren freisetzen. Wenn man diese NP-Zellen jedoch mit dem Helfervirus SSAV überinfiziert ("rescue", vgl. 3.2.3), so findet sich für die entstehenden NP-rescue-Zellen ein positiver Polymerasetest und damit der Nachweis einer Freisetzung von Retroviren.

4.1.3. Untersuchungen zur transformierenden Eigenschaft der Viruspartikel

Der Fokustest, 1958 von Rubin und Temin entwickelt, dient dem Nachweis von transformierendem Virus und der Bestimmung des Virustiters. Er beruht darauf, daß transformierte Zellen einzelne Zellherde (Foci) bilden, die sich vom Hintergrund normaler Fibroblasten abheben. Das Ergebnis des Fokustests soll zeigen, ob die zellfreien Mediumüberstände der verschiedenen Zell-Linien in der Lage sind, Zellen in vitro zu transformieren.

Uninfiizierte Ratten-Nierenzellen (NRK) bzw. Marmoset-Fibroblasten (MFS-4) wurden mit einer logarithmischen Verdünnungsreihe von zellfreien Mediumüberständen von sechs verschiedenen Zell-Linien infiziert (vgl. 3.3.2). 14 Tage nach Infektion wurden die transformierten Zellfoci gezählt. Der Titer an transformierendem Virus wurde als Anzahl der fokusbildenden Einheiten (FBE = Maß für die Zahl von Viruspartikeln, die einen Fokus verursachen) pro Milliliter ausgedrückt. Tabelle 4 zeigt das Ergebnis des Fokustests.

Tabelle 4

Fokustest

Virus- verdün- nung	überstand von uninfizierten Zellen		überstand von NP-Zellen		überstand von NP-rescue- Zellen		überstand von SSV/SSAV HF-Zellen		überstand von Fokuskion "2 g"		überstand von von NRK/SSAV Zellen	
	NRK	MFS-4	NRK	MFS-4	NRK	MFS-4	NRK	MFS-4	NRK	MFS-4	NRK	MFS-4
10^0	0	0	0	0	0	kon- fluent	kon- fluent	kon- fluent	300	200	0	0
10^{-1}	0	0	0	0	400	112	300	96	30	18	0	0
10^{-2}	0	n.d.	0	n.d.	41	n.d.	36	n.d.	4	n.d.	0	0
FBE/ml	0	0	0	0	4×10^3	1×10^3	3×10^3	1×10^3	3×10^2	2×10^2	0	0

FBE = fokusbildende Einheiten
n.d. = nicht durchgeführt

Wie erwartet, produzieren die beiden SSV/SSAV-infizierten Zell-Linien hohe Titer an transformierendem Virus. In den zellfreien Überständen von uninfizierten Zellen und von NP-Zellen waren keine transformierenden Partikel nachweisbar. Dies entspricht den Ergebnissen von 4.3.1. und 4.3.2.

Auch die mit dem Helfervirus SSAV infizierten Zellen produzieren kein transformierendes Virus, obwohl sie, wie in 4.1.2. gezeigt wurde, Partikel mit Polymeraseaktivität freisetzen. Dies zeigt, daß das Helfervirus SSAV allein nicht in der Lage ist, Zellen zu transformieren.

Wenn man jedoch SSV-infizierte und dadurch transformierte NP-Zellen mit dem Helfervirus SSAV überinfiziert ("rescue", vgl. 3.2.3.), so setzen die entstehenden NP-rescue-Zellen hohe Titer an transformierenden Viruspartikeln frei. Dies beweist, daß die NP-Zellen das für die Transformation verantwortliche SSV-Genom enthalten und daß dieses durch Bereitstellung der zur Replikation erforderlichen Information freigesetzt werden kann.

Bei den Untersuchungen in diesem Kapitel konnte gezeigt werden, daß für die folgenden Studien zur Charakterisierung der spezifischen Proteine des SSV/SSAV fünf verschiedene Zell-Linien zur Verfügung stehen.

- (a) uninfizierte Kontrollzellen (MFS-4).
- (b) SSAV-infizierte, nicht transformierte Zellen, die nicht transformierendes Helfervirus SSAV produzieren (NRK-SSAV).

- (c) SSV/SSAV-infizierte und dadurch transformierte Zellen, die transformierendes Retrovirus mit einer physikalischen Dichte von 1.165 g/cm^3 produzieren (SSV/SSAV-HF).
- (d) SSV-infizierte und dadurch transformierte Zellen, die das SSV-Genom enthalten aber keine Partikel freisetzen (NP).
- (e) Durch Überinfektion von (d) mit dem Helfervirus SSV entstandene NP-rescue-Zellen, die sich wie die in (c) beschriebenen Zell-Linien verhalten.

4.2. Darstellung der spezifischen Proteine des SSV/SSAV

Im folgenden sollen die spezifischen Proteine des SSV/SSAV charakterisiert werden. Da SSV/SSAV-Präparationen einen 10 - 100fachen Überschuß an Helfervirus SSV enthalten (Wolfe et al., 1972; Born, 1981), kann man davon ausgehen, daß die dargestellten viralen Proteine in erster Linie Strukturproteine des SSV sind.

Zur Charakterisierung der Proteine dienten Antiseren gegen das Kapsid-Protein p30 (Anti-p30), gegen die Virus-Hüll-Proteine (Anti-gp70), gegen das gesamte Protein des SSV/SSAV (Anti-SSV) sowie normales Kontrollserum. Beschreibung der verwendeten Antiseren, siehe 3.6.1.1.

SSV/SSAV-Partikel produzierende Zellen (vgl. 4.1.) wurden radioaktiv markiert, die gesammelten Mediumüberstände der Zellkulturen wurden pelletiert, lysiert und

immunpräzipitiert (vgl. 3.6.1.3.). Die Proteine wurden im SDS-Gel analysiert und autoradiographiert (vgl. 3.8.2.). Abbildung 3 zeigt die durch Immunpräzipitation isolierten Proteine.

Mit dem Anti-gp70 Serum (Spur B) wurden die bekannten Hüllproteine präzipitiert, nämlich das gp70 und der Komplex p15/p12E (vgl. Thiel et al., 1977; Deinhardt et al., 1978). Die Proteine p15E und p12E finden sich bei Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel stets oberhalb des Markerproteins mit der Molekulargewichtsbezeichnung 15000 d. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß dieses Markerprotein, das Kapsid-Protein p15 des Hühner-Onconorna-Virus, tatsächlich ein Molekulargewicht von nur ungefähr 12000 d hat. Ähnliches gilt auch für die anderen verwendeten Markerproteine. Um Übereinstimmung mit der Literatur zu gewährleisten wurde jedoch darauf verzichtet, das exakte Molekulargewicht anzugeben sondern die allgemein gebräuchlichen Bezeichnungen wurden weiterverwendet.

Die im vorigen Absatz erwähnten Hüllproteine kamen auch bei Präzipitation der Viruspartikel mit dem Anti-SSV-Serum zur Darstellung (Spur C), nicht jedoch bei Verwendung von Anti-p30 oder normalem Kontrollserum (Spur D bzw. A). Es handelt sich also tatsächlich um Proteine mit der Antigenität der Hüllproteine des SSAV.

Bei Immunpräzipitation mit den Antiseren Anti-SSV (Spur C) und Anti-p30 (Spur D) fand sich zusätzlich eine sehr dichte Proteinbande bei 30000 d, die mit dem Kontrollserum nicht gefunden wurde. Es handelt sich dabei um das beschriebene Kapsid-Protein p30 (Deinhardt et al., 1978), das den größten Teil der Masse der Strukturproteine des SSAV ausmacht.

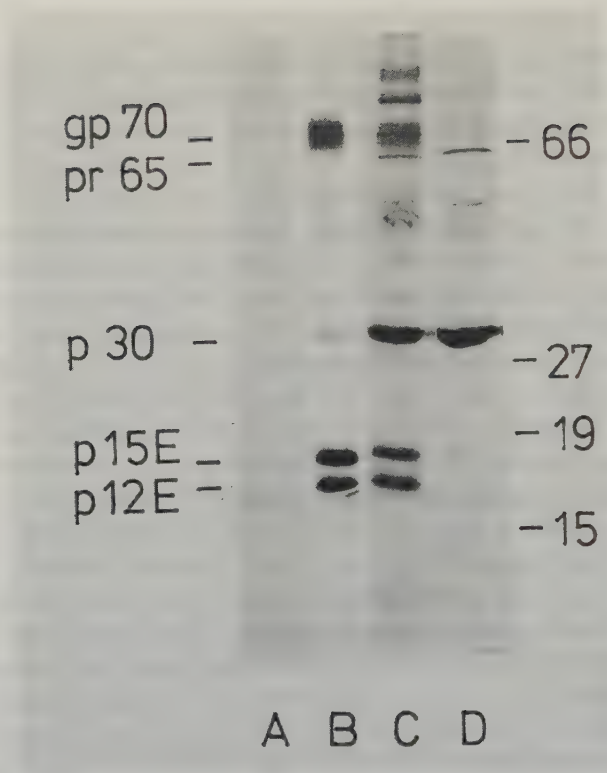


Abbildung 3: Darstellung der spezifischen Proteine radioaktiv markierter SSV/SSAV-Partikel

SSV/SSAV-Partikel produzierende HF-Zellen wurden 90 Minuten lang mit ^{35}S -Methionin markiert. Aus den Mediumüberständen wurden die Viruspartikel durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigt, lysiert und mit verschiedenen Antiseren immunpräzipitiert. Anschließend wurden die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Molekulargewichtsmarkerproteinen verglichen.

Antiseren:	A	Kontrollserum	C	Anti-SSV
	B	Anti-gp70	D	Anti-p30

Zusätzlich zu diesen erwähnten Proteinen konnte bei Immunpräzipitation der isolierten SSV/SSAV-Partikel mit den Antiseren Anti-SSV und Anti-p30 eine Proteinbande gefunden werden, die ein etwas geringeres Molekulargewicht als das Hüllprotein gp70 (MW = 69000-71000 d) und als Rinderserumalbumin (MW = 66000 d) hat (Abbildung 3, Spur C und D). Dieses Protein fand sich bei Präzipitation mit Anti-gp70 und mit dem Kontrollserum nicht. Es handelt sich offensichtlich um ein Strukturprotein des SSV/SSAV mit einem Molekulargewicht von ungefähr 65000 d, das die Antigenität des Kapsid-Proteins p30 besitzt. Dieses Protein dürfte dem bei der Immunpräzipitation der SSV-spezifischen Proteine SSV/SSAV-infizierter Zellen beschriebenen Vorstufen-Protein pr65 entsprechen (Bergholz, 1981; Konze-Thomas und von der Helm, 1981). Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, daß dieses Vorstufen-Protein bei der Reifung des Virus offensichtlich nicht vollständig in die Strukturproteine gespalten wird, sondern zum geringeren Teil in das Viruspartikel eingebaut wird. Diese Beobachtung entspricht den Verhältnissen beim Mäuse-Leukämie-Virus, bei dem ebenfalls eine geringe Menge des Vorstufen-Proteins der Kapsid-Proteine in die Viruspartikel eingebaut wird (Yoshinaka und Luftig, 1977a).

Die kleineren Kapsid-Proteine des SSV, das p10, p12 und p15, sind in dieser Darstellung nicht reproduzierbar gut sichtbar. Das p10 kann mit Methionin nicht radioaktiv markiert werden (Bergholz, 1981), das Phosphoprotein p12 und das p15 können mit den verfügbaren Antisera nicht quantitativ präzipitiert werden.

4.3. Untersuchungen zur Spaltung SSV/SSAV-spezifischer Vorstufen-Proteine in der infizierten Zelle

4.3.1. Darstellung SSV/SSAV-spezifischer Proteine in der infizierten Zelle

Nachdem im vorhergehenden Kapitel die Strukturproteine des SSV mittels Immunpräzipitation der SSV/SSAV-Partikel charakterisiert wurden, sollen nun die SSV/SSAV-spezifischen Proteine in der mit dem Virus infizierten Zelle dargestellt werden. Damit soll geklärt werden, welche spezifischen Proteine in SSV-infizierten, keine Partikel produzierenden NP-Zellen bzw. in SSV/SSAV-infizierten Zellen gefunden werden und ob in der infizierten Zelle Vorstufen-Proteine auftreten, die nicht in die Viruspartikel eingebaut werden.

Es wurden die gleichen Antiseren verwendet wie in 4.2. (Anti-p30, Anti-SSV, Anti-gp70 und normales Kontrollserum). Als Substrat für die Immunpräzipitation dienten radioaktiv markierte Zellen von vier verschiedenen Zell-Linien: (1) SSV-infizierte, keine Partikel produzierende NP-Zellen, (2) NP-rescue-Zellen, die mit dem Helfer-virus SSV überinfiziert waren, (3) SSV/SSAV-infizierte HF-Zellen und (4) uninfizierte Kontrollzellen (MFS-4). Zur genauen Charakterisierung der verschiedenen Zell-Linien, siehe 3.1. und 4.1. Die Zellen wurden jeweils 60 Minuten lang radioaktiv markiert, lysiert und immunpräzipitiert (vgl. 3.6.1.2). Die Proteine wurden im SDS-Gel analysiert und autoradiographiert.

In Abbildung 4 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Charakterisierung der spezifischen Proteine in SSV/SSAV-infizierten HF-Zellen im Vergleich zur uninfizierten Zelle dargestellt. Durch das Antiserum gegen die Hüllproteine des SSAV wurden in der SSV/SSAV-infizierten HF-Zelle die bereits in 4.2 beschriebenen Glykoproteine gp70 und p15E präzipitiert (Abbildung 4, Spur F). Zusätzlich dazu wurden Proteine mit einem Molekulargewicht von ungefähr 45000 d bzw. 27000 d gefunden, die im Gegensatz zum gp70 und p15E nicht im Viruspartikel auftauchten (vgl. 4.2.). Es könnte sich um Intermediate bei der Reifung der Hüllproteine des SSAV handeln. Dies stimmt mit einer Beobachtung von Thiel überein, der bei der Reinigung des gp70 zwei Degradationsprodukte mit einem Molekulargewicht von ungefähr 45000 d bzw. 30000 d entdeckte (Thiel et al., 1978). Möglicherweise entsprechen die hier beschriebenen Proteine diesen beiden Zerfallsprodukten. Alle drei hier beschriebenen Glykoproteine konnten mit dem Antiserum gegen Hüllproteine (Spur F), nicht jedoch mit Kontrollserum (Spur D) präzipitiert werden. Ebensowenig waren sie in uninfizierten Zellen mit dem Antiserum Anti-gp70 darstellbar (Spur G).

Bei der Immunpräzipitation der SSV/SSAV-infizierten HF-Zellen mit dem Antiserum gegen Kapsid-Proteine des SSAV wurde in erster Linie eine intensive Proteinbande bei ungefähr 65000 d gefunden (Spur B). In der uninfizierten Zelle war eine entsprechende Bande nicht nachweisbar (Spur A). Das Protein konnte auch nicht mit dem Antiserum gegen die Hüllproteine des SSAV (Spur C) oder mit Kontrollserum (Spur D) präzipitiert werden. Es handelt sich also um ein Protein, das die Antigenität des Kapsid-

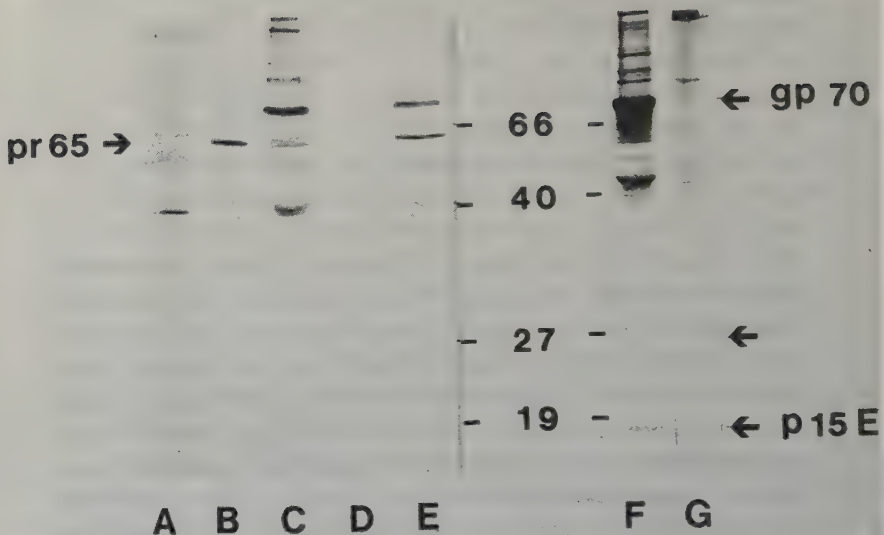


Abbildung 4: Darstellung der spezifischen Proteine in der SSV/SSAV-infizierten HF-Zelle mittels Immunpräzipitation.

Uninfizierte Kontrollzellen bzw. SSV/SSAV-infizierte HF-Zellen wurden jeweils 60 Minuten lang mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Zellen ly-siert und mit verschiedenen Antiseren immunpräzipi-tiert. Die Proteine wurden im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Molekularge-wichtsmarkerproteinen verglichen.

A + G: uninfizierte Zellen immunpräzipitiert mit dem Antiserum Anti-p30 (A) bzw. Anti-gp70 (G).

B - F: SSV/SSAV-infizierte HF-Zellen immunpräzipi-tiert mit dem Antiserum Anti-p30 (B), Anti-gp70 (C + F, F gegenüber C überexponiert), Kontroll-serum (D) bzw. Anti-SSV (E).

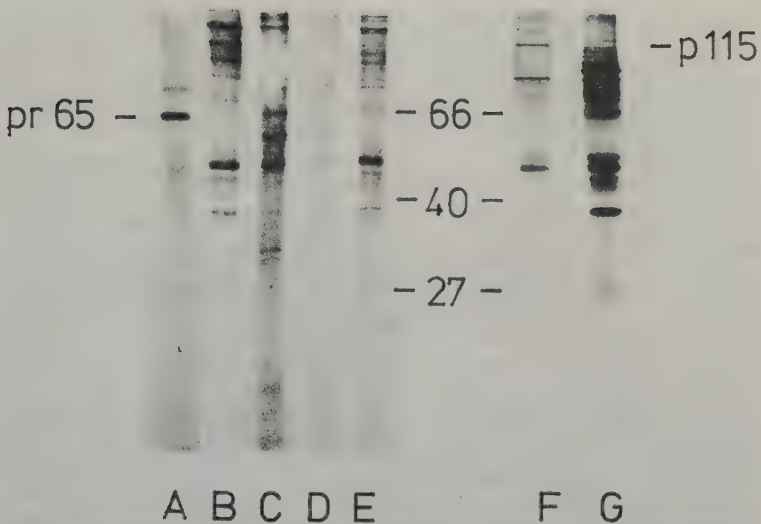


Abbildung 5: Darstellung der spezifischen Proteine in der SSV-transformierten NP-Zelle mittels Immunpräzipitation.

Uninfizierte Kontrollzellen, SSV-transformierte NP-Zellen bzw. mit dem Helfervirus SSV überinfizierte NP-rescue-Zellen wurden jeweils 60 Minuten lang mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mit verschiedenen Antiseren immunpräzipitiert. Die Proteine wurden im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Molekulargewichtsmarkerproteinen verglichen.

- A : mit dem Helfervirus SSV überinfizierte NP-rescue-Zellen immunpräzipitiert mit dem Antiserum Anti-p30.
- B + G: uninfizierte Zellen mit den Antiseren Anti-p30 (B) bzw. Anti-SSV (G).
- C - F: SSV-transformierte NP-Zellen mit den Antiseren Anti-gp70 (C), Kontrollserum (D), Anti-p30 (E) bzw. Anti-SSV (F).

Proteins p30 des SSAV, nicht aber seiner Hüllproteine besitzt. Dieses Protein entspricht dem pr65, dem beschriebenen Vorstufen-Protein des Kapsid-Proteins p30 (Bergholz, 1981; Konze-Thomas und von der Helm, 1981; vgl. 2.2.; 2.3.).

Auf Grund der kurzen Markierungszeit mit ^{35}S -Methionin (1 Stunde Puls-Markierung) konnte man in diesem Experiment noch keine oder eine nur sehr geringe Spaltung des pr65 zu p30 finden. Die drei kleineren Kapsid-Proteine sind aus den oben angegebenen Gründen nicht sichtbar (vgl. 4.2).

In SSV/SSAV-infizierten und transformierten HF-Zellen sind also nach 60-minütiger Puls-Markierung mit ^{35}S -Methionin folgende SSAV-spezifische Proteine nachweisbar: Die beiden Hüllproteine gp70 und pl5E sowie ein Protein von 27000 d mit der Antigenität der Hüllproteine, außerdem das Vorstufen-Protein pr65.

Nachdem im vorhergehenden Abschnitt die SSAV-spezifischen Proteine in der SSV/SSAV-infizierten Zelle identifiziert wurden, soll nun im folgenden geklärt werden, ob diese Proteine auch in der Zelle gefunden werden können, die nur mit dem SSV transformiert ist und keine Viruspartikel produziert (NP-Zelle, vgl. 4.1.), bzw. ob in dieser Zelle andere SSV-spezifische Proteine auftreten.

In Abbildung 5 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Charakterisierung der spezifischen Proteine SSV-infizierter NP-Zellen dargestellt und mit der Analyse uninfizierter Zellen und mit dem Helfervirus SSAV überinfizierter NP-rescue-Zellen (vgl. 3.2.3., 4.1.) verglichen.

Die Ergebnisse der Immunpräzipitation der spezifischen Proteine in der Kontrollzelle (Spur B) und in der NP-rescue-Zelle (Spur A) stimmen mit der Darstellung in Abbildung 4 überein. In der mit dem Helfervirus SSAV überinfizierten NP-rescue-Zelle fand sich wieder das SSAV-spezifische Vorstufen-Protein pr65 (Spur A). Dieses Vorstufen-Protein konnte hingegen in der NP-Zelle weder mit dem Antiserum gegen das Kapsid-Protein p30 (Spur E) noch mit dem Antiserum Anti-SSV (Spur F) präzipitiert werden. Auch die Hüllproteine des SSAV waren in der NP-Zelle nicht nachweisbar (Spur C). Weder mit dem Antiserum gegen Kapsid-Proteine noch mit dem Antiserum gegen Hüllproteine wurde in der NP-Zelle ein SSAV-spezifisches Protein präzipitiert. Alle dargestellten Proteine wurden entweder auch in der Kontrollzelle gefunden (Spur B und G) oder aber sie wurden auch mit dem Normalserum präzipitiert (Spur D). In der NP-Zelle konnten also keine Strukturproteine des SSAV nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit einer früheren Untersuchung der NP-Zellen überein (Bergholz et al., 1977). Im Gegensatz dazu wurden in einer anderen Studie, in der jedoch nicht Marmoset-Fibroblasten sondern Ratten-Nierenzellen verwendet wurden, unterschiedliche Strukturproteine des SSAV in der SSV-infizierten Zelle gefunden (Aaronson et al., 1975). Diese Untersuchungen werden jedoch durch die Tatsache relativiert, daß bereits in den uninfizierten Ratten-Nierenzellen stets zwei verschiedene endogene C-Typ Viren vorhanden sind (Scolnick et al., 1976).

Nur mit dem Antiserum gegen alle Proteine lysierter SSV/SSAV-infizierter Zellen, dem Anti-SSV (vgl. Tabelle 1; 3.6.1.1.), konnte in der NP-Zelle ein spezifisches

Protein dargestellt werden (Spur F). Es liegt im Molekulargewichtsbereich von ungefähr 115000 - 120000 d und wurde weder in der uninfizierten Zelle (Spur G) noch mit Normalserum (Spur D) präzipitiert. Man kann also davon ausgehen, daß es sich um ein SSV-spezifisches Protein handelt, das möglicherweise mit der Transformation der Zelle durch das SSV assoziiert ist.

Bei diesem Protein, das als pll5 bezeichnet wird, könnte es sich möglicherweise um das primäre Translationsprodukt des SSV-Genoms handeln (Born et al., 1982).

4.3.2. Spaltungsreifung der Vorstufen-Proteine in der Wirtszelle (in vivo)

Im folgenden wird das Auftreten von Vorstufen-Proteinen und die Spaltung dieser Vorstufen in die Strukturproteine in der SSV/SSAV-infizierten Zelle untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sollen eine Vergleichsmöglichkeit zu den folgenden in vitro-Spaltungsversuchen bieten.

Um diese in vivo-Spaltungsreifung zu untersuchen, wurden mehrere Petrischalen SSV/SSAV-infizierter HF-Zellen (vgl. 3.1.) in einem noch kürzeren Puls als im vorigen Absatz (4.3.1.) 15 Minuten lang mit ³⁵S-Methionin markiert. Die Zellen einer Schale wurden sofort lysiert und immunpräzipitiert (vgl. 3.6.2.2.), von den Zellen der übrigen Schalen wurde das radioaktive Methionin abgewaschen, und es wurde mit frischem Nährmedium für die unten angegebenen Zeiten weiter inkubiert (sogenannter "chase", vgl. 3.5.1.). Es wurde davon ausgegangen, daß

in den Zellen bei einer nur 15-minütigen Puls-Markierung in erster Linie radioaktiv markierte Vorstufen-Proteine gebildet werden, die jedoch infolge der kurzen Inkubationszeit noch nicht gespalten sind. In dieser Probe wird also vornehmlich radioaktiv markiertes Vorstufen-Protein zu erwarten sein. Bei unterschiedlich langer Weiterinkubation mit frischem Nährmedium ("chase") hingegen sollte eine sukzessive Spaltung der Vorstufen in die Strukturproteine zu erwarten sein. Demzufolge sollte in diesen Proben eine Verminderung der Vorstufen und ein Auftreten anderer Proteine zu beobachten sein. Alle Zellen wurden im Anschluß an Puls-Markierung und "chase" lysiert und immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden im SDS-Gel analysiert und autoradiographiert.

4.3.2.1. Spaltungsreifung der Kapsid-Proteine (gag)

Die Untersuchung der intrazellulären Kapsid-Proteine wurde mit dem Antiserum Anti-p30 durchgeführt, das spezifisch gegen das größte Kapsid-Protein p30 gerichtet ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

Unmittelbar nach Puls-Markierung (Spur A) war nur eine Proteinbande sichtbar, die dem Vorstufen-Protein pr65 entspricht. Nach Puls-Markierung und einem "chase" von 24 Stunden Dauer (Spur B) war diese Proteinbande stark abgeschwächt, doch blieb eine geringe Menge pr65 erhalten. Nach dem "chase" waren drei Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von ungefähr 52000 d, 38000 d bzw. 30000 d neu aufgetaucht. Letztere Bande entspricht dem

Kapsid-Protein p30, das auch in den SSV/SSAV-Partikeln gefunden wurde (vgl. 4.2.). Im Gegensatz dazu wurden die beiden anderen Proteine nicht in den Viruspartikeln gefunden (vgl. 4.2.). Es könnte sich dabei um Zwischenprodukte der Spaltungsreifung des pr65 zu den Kapsid-Proteinen handeln (sogenannte "intermediäre Vorstufen"). Um diese Hypothese zu prüfen, sollte der zeitliche Ablauf der Spaltungsreifung des pr65 in der Wirtszelle untersucht werden. Dazu wurde eine Kinetik des "chase" angefertigt.

Abbildung 6, Spur C - F zeigt das Ergebnis dieser Kinetik. In Spur C wurde wiederum das Immunpräzipitat unmittelbar nach Puls-Markierung aufgetragen. Bereits nach einem "chase" von 60 Minuten Dauer (Spur D) fand sich die intensive Bande des durch Spaltungsreifung entstandenen Proteins p30. Erheblich schwächer als das p30 war auch das Protein von 52000 d (p52) bereits sichtbar. Nach einem "chase" von 3 Stunden (Spur E) bzw. von 8 Stunden Dauer (Spur F) nahm die Intensität beider Proteinbanden, insbesondere aber des p52, kontinuierlich zu, begleitet von einer entsprechenden Verminderung des Vorstufen-Proteins pr65. Beide Proteine entstehen also bei der Spaltungsreifung des pr65. Dies stimmt mit der Untersuchung von Bergholz überein, die ebenfalls nach Puls-Markierung und nachfolgendem "chase" das p30 sowie ein Protein von 52000 d zeigt. In dieser Untersuchung ist das p52 als Intermediat der Spaltungsreifung des pr65 diskutiert (Bergholz, 1981). Normalerweise wird ein derartiges Zwischenprodukt zu Beginn der Spaltungsreifung gebildet und später vollständig in die Strukturproteine gespalten. Die Intensität der Bande des p52 nahm jedoch auch bei längerer Dauer

Zu Abbildung 6 und 7:

Mehrere Petrischalen SSV/SSAV-infizierter HF-Zellen wurden jeweils 15 Minuten lang mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert (Puls-Markierung). Ein Teil der Zellen wurde unmittelbar nach Puls-Markierung lysiert und immunpräzipitiert, von den anderen Zellen wurde das radioaktive Methionin abgewaschen, und es wurde für die angegebenen Zeiten mit frischem Nährmedium weiter inkubiert ("chase"). Anschließend wurden auch diese Zellen lysiert und immunpräzipitiert. Die Proteine wurden im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Molekulargewichtsmarkerproteinen verglichen.

Abbildung 6: Immunpräzipitation mit dem Antiserum Anti-p30

- A + C 15 Minuten Puls-Markierung
- B Puls-Markierung und "chase" von 24 Stunden Dauer
- D - F Puls-Markierung und "chase" von 60 Minuten (D), 3 Stunden (E) bzw. 8 Stunden (F) Dauer

Abbildung 7: Immunpräzipitation mit dem Antiserum Anti-gp70

- A 15 Minuten Puls-Markierung
- B Puls-Markierung und "chase" von 24 Stunden Dauer

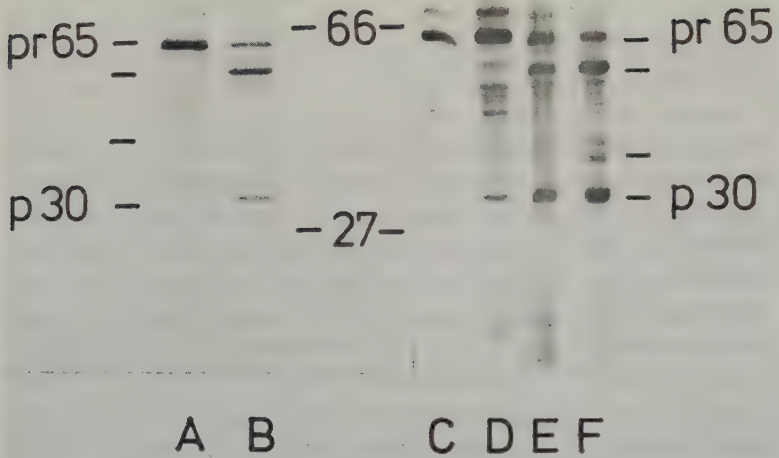


Abbildung 6: Darstellung der Spaltungsreifung der gag-Proteine des SSV/SSAV in vivo

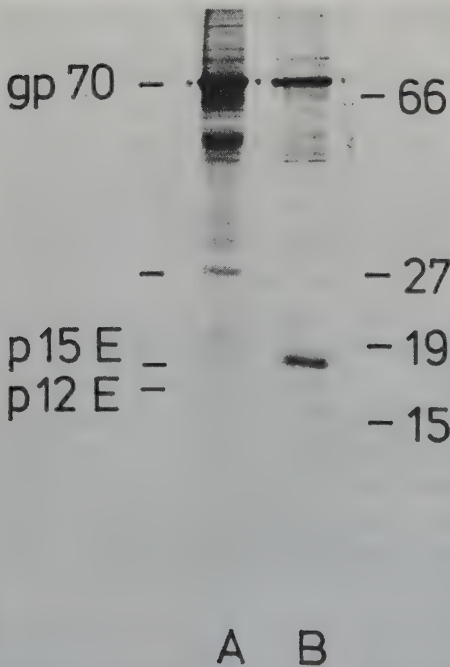


Abbildung 7:

Darstellung der Spaltungsreifung der Hüllproteine des SSV/SSAV in vivo

des "chase" weiter zu und nicht wieder ab. Auch nach einem "chase" von 24 Stunden Dauer war noch eine intensive p52-Bande zu sehen. Man muß also annehmen, daß die Bildung des p52 effektiver ist als die weitere Spaltung in die Strukturproteine und das p52 deshalb kumuliert. Ähnliches ist für die in vitro-Spaltung des Vorstufen-Proteins pr76 beim Rous-Sarkom-Virus mit p15-Protease beschrieben. Hierbei entsteht ein Intermediat von 32000 d (pr32), das zwar das vollständige Strukturprotein p19 enthält, jedoch nicht oder nur in geringem Ausmaß weiter in dieses Strukturprotein gespalten wird und deshalb kumuliert (von der Helm, 1977; Vogt et al., 1979). Andererseits könnte es sich bei dem hier untersuchten Protein p52 jedoch auch um ein Endprodukt der Spaltung des pr65 handeln, das aber nicht in das Virus eingebaut wird.

Ähnliches gilt für das dritte Produkt der Spaltungsreifung des pr65 in vivo, das Protein von 38000 d (p38). Es war in diesem Experiment erst nach einem "chase" von 8 Stunden Dauer nachweisbar. Dieses Protein wurde also später und in geringerem Umfang bei der Spaltungsreifung des pr65 gebildet. Da auch diese Proteinbande nach einem "chase" von 24 Stunden Dauer weiter vorhanden war, gilt für das p38 das gleiche wie oben für das p52 gesagt.

Ob auch die drei kleineren Kapsid-Proteine bei der Spaltungsreifung des pr65 entstehen, konnte aus den oben genannten Gründen nicht untersucht werden (vgl. 4.2.).

Die Untersuchung der Spaltungsreifung des Vorstufen-Proteins pr65 in der SSV/SSAV-infizierten Zelle erbrachte drei Produkte dieser Reifung:

- (1) das Kapsid-Protein p30
- (2) p52
- (3) p38

Außerdem bleibt oft ein kleinerer Teil des p65 ungespalten.

4.3.2.2. Spaltungsreifung der Hüllproteine (env)

Um spezifisch die Hüllproteine des SSAV darzustellen, wurden die folgenden Untersuchungen mit dem gegen Hüllproteine gerichteten Antiserum Anti-gp70 (vgl. 3.6.1.1) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

Spur A zeigt das Immunpräzipitat unmittelbar nach einer Puls-Markierung von 15 Minuten Dauer, Spur B nach Puls-Markierung und nachfolgendem "chase" von 24 Stunden Dauer.

Bereits nach der Puls-Markierung war das größte Glykoprotein der äußeren Hülle, das gp70, sowie das weiter oben bereits erwähnte Protein von 27000 d (vgl. 4.3.1.) sichtbar, nicht jedoch der Komplex der beiden kleineren Glykoproteine p15E/p12E (Spur A). Nach einem "chase" von 24 Stunden Dauer war die Intensität der gp70-Bande gemindert, das Protein von 27000 d war nicht mehr nachweisbar, dafür trat jedoch jetzt der Komplex p15E/p12E auf. Diese beiden Proteine waren aus technischen Gründen nicht voneinander zu trennen (vgl. dazu: von der Helm, 1977). Das Protein von 27000 d scheint demnach, wie vermutet, ein Intermediat bei der Reifung der Glykoproteine der äußeren Hülle zu sein.

Auf Grund der dargestellten Ergebnisse kann man davon ausgehen, daß bei der Reifung des SSAV das Glykoprotein gp70 als ein sehr frühes Produkt entsteht. Es war bereits nach einer Markierungszeit von nur 15 Minuten nachweisbar. Im Gegensatz dazu entsteht der Komplex p15E/p12E erheblich später über ein Intermediat von 27000 d. Für die Existenz eines großmolekularen Vorstufen-Proteins aller drei Glykoproteine der äußeren Hülle konnte in dieser Untersuchung kein Anhalt gefunden werden.

4.3.3. In vitro-Spaltung isolierter Vorstufen-Proteine mit der p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus

4.3.3.1. Charakterisierung der p15-Protease

Beim Hühner-Oncorna-Virus wird das Vorstufen-Protein pr76 durch das Kapsid-Protein p15 spezifisch in die vier Kapsid-Proteine p27, p19, p15 und p12 gespalten. Diese Spaltung konnte durch Experimente in vivo und in vitro nachgewiesen werden (vgl. 2.3.).

Es ist weiterhin möglich, das durch Immunpräzipitation isolierte pr76 im vollständigen Immunkomplex mit der p15-Protease spezifisch zu spalten (Dittmar und Mölling, 1978). Es ist für diese Spaltung mit p15 demnach nicht von Bedeutung, ob das Substrat, das pr76, an einen Antikörper und an Sepharose-Protein A gebunden ist. Das pr76 verliert also im Immunkomplex nicht seine Spezifi-

tät für das Enzym und auch die Effektivität der Spaltung wird durch den Antikörper nicht beeinträchtigt.

Das p15 spaltet nicht nur das Vorstufen-Protein des Hühner-Oncorna-Virus sondern auch die Vorstufen-Proteine verschiedener anderer C-Typ Retroviren (vgl. 2.3.). Diese Spaltung ist jedoch spezifisch für die Vorstufen-Proteine der Kapsid-Proteine, die Vorstufen der Glykoproteine werden mit der p15-Protease nicht gespalten (Mölling et al., 1980)

Andere Proteine wie Rinderserumalbumin, Ovalbumin oder Casein werden durch p15-Protease in ihrer nativen Form nicht gespalten, außer, sie wurden vorher durch Kochen in SDS vollständig denaturiert (Dittmar und Mölling, 1980; von der Helm und Konze-Thomas, 1981).

Die optimalen Bedingungen für die Spaltung des gag-Vorstufen-Proteins pr76 des Hühner-Oncorna-Virus mit der p15-Protease sind ein leicht saurer pH von 6.5 und eine Salzkonzentration von 0.15 M NaCl (Vogt et al., 1979). Die Protease kann durch einige Inhibitoren der Thiol-Proteasen blockiert werden (Dittmar und Mölling, 1978; von der Helm und Konze-Thomas, 1981). Weiterhin ist es möglich, die Spaltung mit p15-Protease durch bestimmte Oligopeptide kompetitiv zu inhibieren (von der Helm, 1983; vgl. 2.3.). Diese Oligopeptide zeichnen sich durch eine große Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenz mit den bekannten Spaltstellen des pr76 aus.

4.3.3.2. Kinetik der in vitro-Spaltung mit p15-Protease

Wie erwähnt, konnte bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden, daß mit der p15-Protease auch die Vorstufen-Proteine anderer C-Typ Retroviren gespalten werden können (vgl. 2.3.), so auch das Vorstufen-Protein des SSAV, das pr65 (Konze-Thomas und von der Helm, 1981). Diese Spaltung soll im folgenden näher charakterisiert werden, die Reaktionsbedingungen und Spaltprodukte definiert und mit der Spaltungsreifung in vivo verglichen werden. Des weiteren dient diese Untersuchung als Voraussetzung zum Vergleich der Spaltung des pr65 durch p15-Protease mit einer zu prüfenden Spaltung durch eine SSV/SSAV-assoziierte proteolytische Aktivität, die im Abschnitt 4.3.4. untersucht wird.

Als Substrat für die Spaltungsversuche diente durch Immunpräzipitation isoliertes, radioaktiv markiertes Vorstufen-Protein pr65. Es wurde ein gegen die Kapsid-Proteine des SSAV gerichtetes Antiserum verwendet. Der Spaltungsansatz ist in 3.7.1. beschrieben, Abweichungen werden im Text angegeben. Die Proben wurden im Anschluß an die Spaltung im SDS-Gel analysiert und autoradiographiert.

Zunächst sollte eine Kinetik der Spaltung des pr65 mit p15-Protease erstellt werden. Das isolierte, radioaktiv markierte pr65 wurde in Aliquots aufgeteilt, ein Aliquot als Kontrolle ohne Spaltungsreaktion sofort zur gelelektrophoretischen Auftrennung mit SDS denaturiert, die anderen Aliquots wurden verschiedene Zeiten lang mit p15 inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Ergebnis des Experiments ist in Abbildung 8a darge-

stellt. In Spur A ist das pr65 unmittelbar nach Puls-Markierung, in Spur B - E nach Puls-Markierung und unterschiedlich langer pl5-Spaltung gezeigt.

Bereits nach 60-minütiger Inkubation des pr65 mit pl5-Protease waren im Vergleich zur Kontrolle neue Proteinbanden aufgetaucht, die bei längerer Inkubation an Intensität zunahmen. Es fand sich eine kräftige Proteinbande bei ungefähr 52000 d, sowie zwei schwächere Banden bei ungefähr 32000 bzw. 30000 d. Alle drei Banden verstärkten sich bei längerer Inkubation, begleitet von einer entsprechenden Verminderung des pr65. Sie entstanden also als Spaltprodukte des pr65. Dabei überwog eindeutig die Spaltung zu dem Protein von 52000 d (p52), die beiden anderen Proteinbanden waren vergleichsweise wenig intensiv. In der Untersuchung der pl5-Spaltung des pr65 von Konze-Thomas wurde das Protein von 30000 d als das Kapsid-Protein p30, das Protein von 32000 d als Intermediat der Spaltung zu kleineren Kapsid-Proteinen diskutiert (Konze-Thomas und von der Helm, 1981). Sollte letzteres der Fall sein, so wird die weitere Spaltung zu den kleineren Kapsid-Proteinen jedoch anscheinend nicht durch das pl5 induziert. Die Bande bei 32000 d blieb auch bei längerer Inkubation erhalten und kleinere Spaltprodukte wurden nicht gesehen.

Nach 3 Stunden Inkubation sah man eine weitere Bande bei ungefähr 40000 d neu auftauchen (p40). Dabei handelt es sich offensichtlich um ein spät entstehendes Spaltprodukt des pr65. Auch diese Proteinbande nahm bei längerer Inkubation an Intensität zu; es handelt sich demnach vermutlich nicht um ein instabiles Intermediat, das im weiteren Verlauf der pl5-Spaltung vollständig gespalten wird.

Zu Abbildung 8a - 8d:

SSV/SSAV-infizierte HF-Zellen wurden 30 Minuten lang mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mit dem Antiserum Anti-p30 immunpräzipitiert. Danach wurden die Immunpräzipitate verschiedenen in vitro-Spaltungsversuchen mit der p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus unterzogen (8a - 8c). In einem anderen Spaltungsversuch wurden die Zellen nach der radioaktiven Markierung zunächst einer in vivo-Spaltungsreifung ("chase", vgl. 3.5.1.) ausgesetzt und erst danach immunpräzipitiert und mit p15-Protease gespalten (8d). Die Proteine wurden nach abgeschlossener Spaltung im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Molekulargewichtsmarkerproteinen verglichen.

Abbildung 8a:

- A Kontrolle, Analyse des Immunpräzipitates ohne Spaltung
- B-E Inkubation des Immunpräzipitates mit p15-Protease für eine Dauer von 60 Minuten (B), 3 Stunden (C), 5 Stunden (D) bzw. 8 Stunden (E)

Abbildung 8b:

- A Kontrolle ohne Spaltung
- B-D Inkubation des Immunpräzipitates mit p15-Protease für 8 Stunden bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen im Spaltungsansatz B 0.01 M NaCl C 0.15 M NaCl D 0.5 M NaCl

Abbildung 8c:

- A Kontrolle ohne Spaltung
- B Inkubation des Immunpräzipitates mit p15-Protease für 8 Stunden
- C wie B bei Zugabe von 100 μg Oligopeptid A (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met)
- D wie B bei Zugabe von 100 μg Oligopeptid B (Lys-Phe-Ile-Gly-Leu-Met)

Abbildung 8d:

- A Immunpräzipitat der spezifischen Proteine nach abgeschlossener in vivo-Spaltungsreifung
- B Inkubation des Immunpräzipitates (vgl. Spur A) für 8 Stunden ohne Zugabe einer proteolytischen Aktivität
- C Inkubation des Immunpräzipitates (vgl. Spur A) für 8 Stunden mit p15-Protease

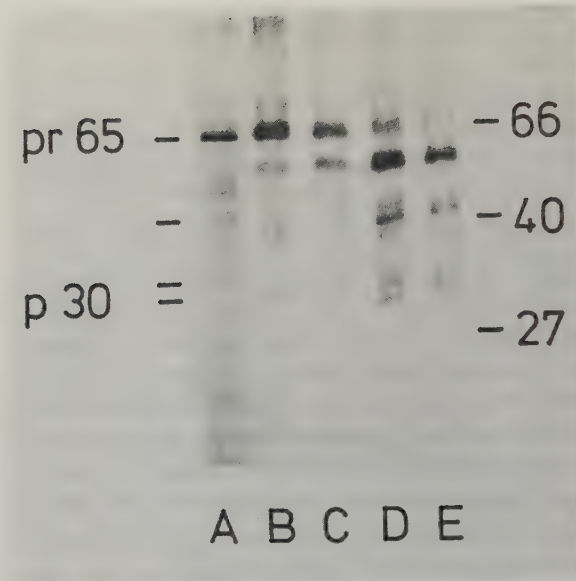


Abbildung 8a:

In vitro-Spaltung
des isolierten Vor-
stufen-Proteins
pr65 mit der p15-
Protease des Hüh-
ner-Oncorna-Virus.
Kinetik der Spal-
tung

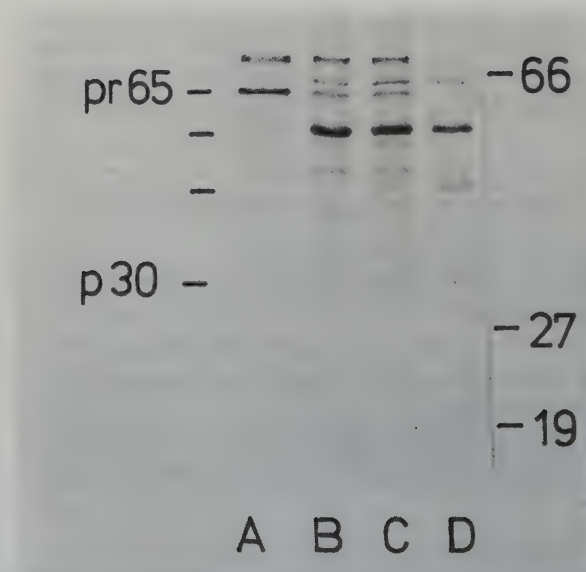


Abbildung 8b:

In vitro-Spaltung
des isolierten Vor-
stufen-Proteins
pr65 mit der p15-
Protease bei unter-
schiedlichen Salz-
konzentrationen im
Spaltungsansatz

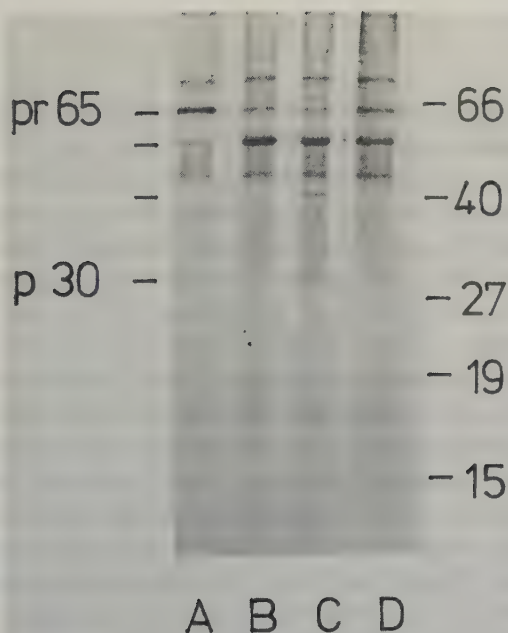


Abbildung 8c:

In vitro-Spaltung
des isolierten Vor-
stufen-Proteins
pr65 mit p15-Pro-
tease bei Zugabe
verschiedener inhi-
bitorisch wirksa-
mer Oligopeptide
zum Spaltungsan-
satz

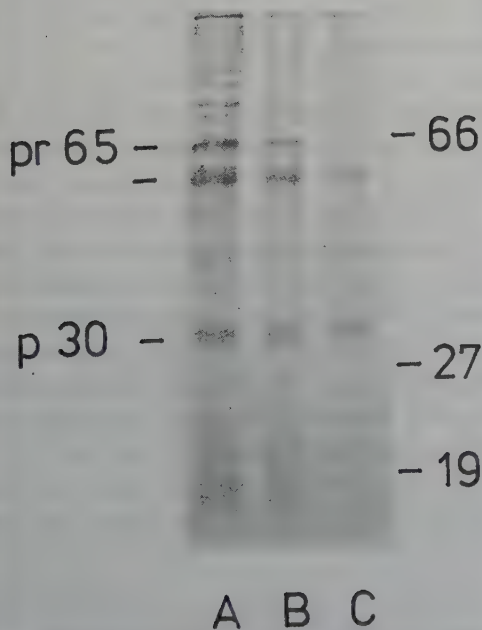


Abbildung 8d:

In vitro-Spaltung
des Vorstufen-Pro-
teins pr65, das
nach abgeschlosse-
ner Spaltungsrei-
fung in der Wirts-
zelle vorhanden
ist, mit p15-Pro-
tease

Bei der Spaltung des pr65 mit der pl5-Protease wurden also vier Spaltprodukte gebildet:

(1) als wichtigstes Produkt das p52, (2) als spätes Produkt das p40 sowie (3) und (4) zwei relativ früh entstehende Produkte, die jedoch in geringerem Umfang gebildet wurden, nämlich das p30 und ein Protein von ungefähr 32000 d.

In Abbildung 8b ist zu erkennen, daß diese Spaltung tatsächlich durch die pl5-Protease induziert wurde und nicht durch autokatalytische Wirkung während der Inkubation des pr65 in Spaltungspuffer vor sich ging. Spur A zeigt isoliertes pr65, das 8 Stunden ohne Zugabe von pl5 in Spaltungspuffer inkubiert wurde, in Spur B ist die gleiche Inkubation nach Zugabe von pl5 dargestellt. Es zeigt sich, daß keines der Spaltprodukte der pl5-Spaltung autokatalytisch ohne Zugabe einer proteolytischen Aktivität entsteht. In Spur A ist das Vorstufen Protein pr65 vollständig ungespalten geblieben.

Spur B, C und D der Abbildung 8b zeigen den Einfluß der Salzkonzentration auf die pl5-Spaltung des pr65. Bei einer Konzentration von 0.01 M NaCl (Spur B) bzw. 0.15 M NaCl (Spur C) im Spaltungspuffer war das Ergebnis weitgehend identisch, es entstand in erster Linie p52, außerdem eine geringe Menge der anderen oben beschriebenen Spaltprodukte. Ein kleiner Teil des pr65 blieb ungespalten. Wurde die Salzkonzentration auf 0.5 M NaCl erhöht (Spur D), so wurde auch dieser Teil des pr65 gespalten. Dabei entstand in erster Linie p40, die anderen Proteinbanden blieben weitgehend unverändert.

Das Experiment zeigt, daß der größte Teil der p15-Spaltung des pr65 zu dem Protein p52 verläuft und daß diese Spaltung unabhängig von der Salzkonzentration ist. Hingegen bleibt bei niedrigen Salzkonzentrationen ein kleinerer Teil des pr65 ungespalten, der erst bei Erhöhung der Salzkonzentration zu p40 gespalten wird. Es scheint sich demnach um zwei verschiedene Formen der p15-Spaltung des pr65 zu handeln. Die beiden Proteine bei 30000 d wurden in diesem Experiment nicht in so ausreichender Menge gebildet, daß ihre Abhängigkeit von der Salzkonzentration beurteilt werden konnte. Die Bande bei 66000 d in Spur B - D dürfte ohne Bedeutung für diese Untersuchung sein. Es handelt sich vermutlich um eine unspezifische p15-Spaltung eines unbekannten großmolekularen Proteins, die hier nicht weiter erklärt werden kann.

Da beim Hühner-Oncorna-Virus die p15-Spaltung des Vorstufen-Proteins durch Inkubation der Protease mit bestimmten Oligopeptiden inhibiert werden kann (vgl. 2.3.), soll nun der Einfluß dieser Oligopeptide auf die Spaltung des pr65 mit p15-Protease untersucht werden.

In Abbildung 8c ist das Ergebnis dieses Experiments dargestellt. Spur A zeigt die Kontrolle, isoliertes pr65, das 8 Stunden bei einer Salzkonzentration von 0.5 M NaCl ohne Zugabe einer proteolytischen Aktivität inkubiert wurde. Spur B, C und D zeigen den gleichen Ansatz nach Zugabe von p15, bzw. p15 und Oligopeptid A oder B (Aminosäuresequenz der Peptide vgl. 3.7.1.). Das Experiment zeigt, daß das Oligopeptid A keinen Einfluß auf die p15-Spaltung des pr65 hatte, die Spaltung verlief genauso wie ohne Zugabe des Peptids. Dagegen erfolgte bei Zugabe

.

von Oligopeptid B eine geringfügige Veränderung des Spaltungsmusters. Es blieb mehr ungespaltenes pr65 zurück, und das p40 wurde nicht gebildet. Peptid B scheint also die erst bei höheren Salzkonzentrationen effektiv werdende Spaltung zu p40 zu inhibieren, wohingegen die Spaltung zu p52 unbeeinflusst bleibt.

In 4.3.2.1. konnte gezeigt werden, daß in SSV/SSAV-infizierten Zellen stets ein geringer Teil des pr65 ungespalten bleibt und anscheinend in die Viruspartikel eingebaut wird. Es stellt sich die Frage, ob es sich bei dem ungespaltenen pr65 um den Rest einer uniformen Population von pr65 handelt oder ob es zwei qualitativ unterschiedliche Formen des pr65 gibt, von denen eine Form für eine proteolytische Aktivität nicht angreifbar ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurde das in der Wirtszelle nach vorausgegangener in vivo-Spaltungsreifung verbleibende, ungespaltene pr65 einer nachträglichen in vitro-Spaltung mit der p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus unterzogen.

SSV/SSAV-infizierte Zellen wurden radioaktiv markiert, anschließend wurde ein "chase" von 24 Stunden Dauer durchgeführt (vgl. 3.5.1.). In Abbildung 8d zeigt Spur A das Immunpräzipitat des pr65 nach abgeschlossenem "chase", Spur B nach "chase" und anschließender Inkubation ohne Zugabe von p15, Spur C mit p15. Es wird deutlich, daß mit p15 auch die in der Wirtszelle nicht gespaltene Fraktion des pr65 vollständig spaltbar ist. Die dabei entstehenden Spaltprodukte konnten jedoch nicht analysiert werden, da nach abgeschlossenem "chase" nur mehr eine sehr geringe Menge pr65 zur Spaltung zur Verfügung stand.

Zu Abbildung 8e und 8f:

SSV/SSAV-infizierte HF-Zellen wurden 30 Minuten lang mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Zellen entweder einem "chase" von 24 Stunden Dauer unterzogen und danach immunpräzipitiert oder aber direkt immunpräzipitiert und in vitro mit p15-Protease gespalten. Zur Immunpräzipitation diente jeweils das Antiserum Anti-p30. Die Proteine wurden jeweils parallel in zwei verschiedenen Gelelektrophorese-Systemen aufgetrennt.

Abbildung 8e: Analyse der Proteine durch Polyacrylamid-gelelektrophorese in Gegenwart von Harnstoff und Acetatpuffer

- A In vitro-Spaltung mit p15-Protease
- B Kontrolle, Analyse des Immunpräzipitates ohne Spaltung
- C In vivo-Spaltungsreifung ("chase")

Abbildung 8f: Analyse der Proteine durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

- A In vitro-Spaltung mit p15-Protease
- B Kontrolle, Analyse des Immunpräzipitates ohne Spaltung
- C in vivo-Spaltungsreifung ("chase")

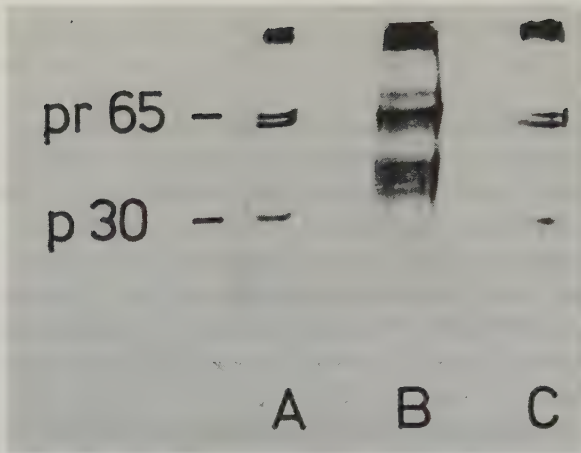


Abbildung 8e: Vergleich der Spaltungsreifung des Vorstufen-Proteins pr65 in der Wirtszelle mit der in vitro-Spaltung mit p15-Protease
(1) Analyse im Harnstoff-Gel

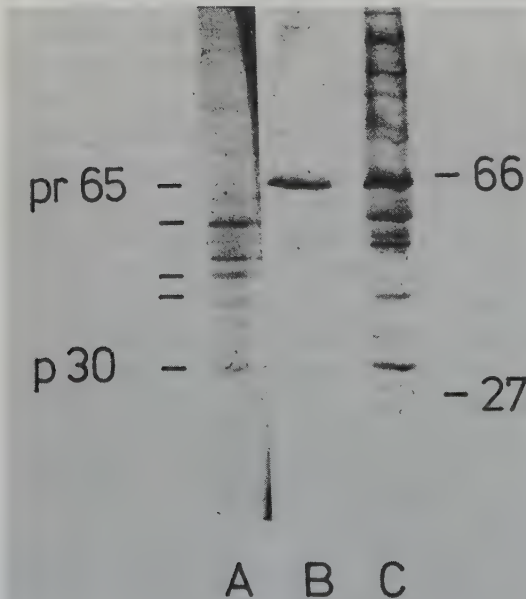


Abbildung 8f:

Vergleich der Spaltungsreifung des Vorstufen-Proteins pr65 in der Wirtszelle mit der in vitro-Spaltung mit p15-Protease
(2) Analyse im SDS-Polyacrylamidgel

Im folgenden werden die bei der in vitro- Spaltung des pr65 mit p15-Protease entstehenden Spaltprodukte mit den Produkten der in vivo-Spaltungsreifung in der Wirtszelle verglichen.

Dazu wurden die Proteine der Spaltungsansätze jeweils parallel in zwei verschiedenen Gelelektrophorese-Systemen analysiert. Es wurde ein Harnstoff-Gel, das nach dem Molekulargewicht und der elektrischen Ladung der Proteine auftrennt, und ein SDS-Gel, bei dem alle Proteine eine negative Ladung tragen und das deshalb nur nach dem Molekulargewicht der Proteine auftrennt, verwendet (vgl. 3.8.2.).

Die Spaltungsansätze wurden wie beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden radioaktiv markiert, anschließend entweder immunpräzipitiert und mit p15-Protease gespalten oder einem "chase" von 24 Stunden Dauer unterzogen und danach immunpräzipitiert. Anschließend wurden die Proben in je zwei gleiche Teile geteilt und jeweils parallel im Harnstoff- bzw. SDS-Gel analysiert und autoradiographiert.

In Abbildung 8f ist die Auftrennung im SDS-Gel, in Abbildung 8e im Harnstoff-Gel dargestellt. Im SDS-Gel findet sich ein ähnliches Muster für die Spaltungsreifung in der Wirtszelle und für die p15-Spaltung. Die beiden Spaltprodukte p52 und p30 hatten in beiden Spaltungsversuchen eine identische Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-Gel. Das gleiche gilt, wie Abbildung 8e zeigt, für ihre Wanderungsgeschwindigkeit im Harnstoff-Gel. Man kann also davon ausgehen, daß die Spaltprodukte p52 und p30, die bei der Spaltungsreifung des pr65 in der Wirtszelle und bei der in vitro-Spaltung des pr65

mit p15-Protease entstehen, identische Proteine sind. Sie stimmen in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in zwei voneinander unabhängigen Auftrennungsverfahren überein.

Die Experimente in diesem Kapitel zeigen, daß das pr65 mit p15-Protease vollständig spaltbar ist. Es entstehen vier Spaltprodukte: p52, p40, p30 und ein Protein von 32000 d. Die Spaltprodukte p52 und p30 sind offensichtlich mit den bei der Spaltungsreifung in vivo entstehenden Produkten identisch. Der größte Teil des pr65 wird zu p52 gespalten, die Spaltung zu p30 und dem Protein von 32000 d macht nur einen geringen Teil der Spaltung mit p15-Protease aus. Bei der Spaltung zu p40 scheint es sich um einen Nebenweg der p15-Spaltung zu handeln, der erst bei höherer Salzkonzentration effektiv wird und der durch Zugabe eines bestimmten Oligopeptids kompetitiv inhibierbar ist, was beides für die Spaltung zu p52 nicht zutrifft.

4.3.4. In vitro-Spaltung isolierter Vorstufen-Proteine mittels SSV/SSAV-assoziiierter proteolytischer Aktivität

4.3.4.1. Nachweis einer SSV/SSAV-assoziierten proteolytischen Aktivität

Nachdem in den vorhergehenden Abschnitten gezeigt werden konnte, daß das Vorstufen-Protein des SSAV, das pr65, sowohl in vivo in die Strukturproteine des SSAV gespalten wird als auch in vitro mit p15-Protease ge-

spalten werden kann, soll nun untersucht werden, ob diejenige proteolytische Aktivität, die für die intrazelluläre Spaltung verantwortlich ist, isoliert nachgewiesen und charakterisiert werden kann. Eine entsprechende proteolytische Aktivität wurde bisher außer für das Hühner-Oncornavirus (vgl. 4.3.3.1.) auch für das Mäuse-Leukämie-Virus (Yoshinaka und Luftig, 1977b; 1977c) und für das Mamma-Tumor-Virus der Maus (Sen et al., 1980) nachgewiesen.

Als Substrat für die Experimente diente wieder das durch Immunpräzipitation isolierte, radioaktiv markierte Vorstufen-Protein pr65. Zur Immunpräzipitation wurde ein gegen die Kapsid-Proteine des SSAV gerichtetes Antiserum verwendet. Der Spaltungsansatz ist in 3.7.2. bzw. 3.7.3. beschrieben. Die Proben wurden im Anschluß an die Spaltung im SDS-Gel analysiert und autoradiographiert.

Zunächst soll untersucht werden, ob in Extrakten von SSV/SSAV-infizierten Zellen eine proteolytische Aktivität nachweisbar ist, die isoliertes pr65 in vitro spaltet. In diesen Extrakten sollte eine in der Wirtszelle wirksame proteolytische Aktivität nachzuweisen sein, unabhängig davon, ob sie zellulären oder viralen Ursprungs ist.

In Abbildung 9a ist das isolierte pr65 unmittelbar nach Puls-Markierung (Spur A), nach Puls-Markierung und einem "chase" von 24 Stunden Dauer (Spur B, vgl. 3.5.1.), bzw. nach Puls-Markierung und 8 Stunden Inkubation mit einem Extrakt aus lysierten SSV/SSAV-infizierten Zellen (Spur C, vgl. 3.7.3.) dargestellt.

Das Ergebnis nach Puls-Markierung und nach Puls-Markierung und folgendem "chase" entsprach den beschriebenen

Untersuchungen zur Spaltungsreifung des pr65 in vivo (vgl. 4.3.2.1.). Die Analyse der Proteine nach Inkubation des pr65 mit einem Extrakt aus lysierten Zellen zeigte, daß aus der SSV/SSAV-infizierten Zelle eine proteolytische Aktivität extrahierbar war, die isoliertes pr65 in vitro spaltete. Als signifikante Spaltprodukte entstanden dabei zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von ungefähr 38000 bzw. 30000 d. Außerdem war nach diesem Spaltungsansatz die Gesamtmenge an meßbarem, radioaktiv markiertem Protein vermindert, was vermutlich auf einen unspezifischen Verdau durch zelluläre Proteasen (z.B. Trypsin und andere) zurückzuführen ist, die in diesem Experiment aus technischen Gründen vorhanden waren. Aus diesem Grund konnte nicht sicher geklärt werden, ob bei dieser Spaltung weitere Spaltprodukte gebildet werden.

Da die beiden Produkte der Spaltung des pr65 mit einem Extrakt aus lysierten Zellen in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-Gel mit dem p38 und p30, den beschriebenen Produkten der Spaltungsreifung des pr65 in der Wirtszelle übereinstimmten, kann man davon ausgehen, daß es sich um identische Proteine handelt. Bei der durch einen Zellextrakt induzierten Spaltung wurde jedoch kein Protein mit einem Molekulargewicht von 52000 d gefunden, das bei der Spaltungsreifung in vivo regelmäßig als drittes Produkt gebildet wurde (vgl. 4.3.2.1.).

Das Experiment beweist, daß in der SSV/SSAV-infizierten Zelle eine proteolytische Aktivität existiert, die das Vorstufen-Protein des SSV in vitro spezifisch spaltet. Es stellt sich die Frage, ob diese proteolytische Aktivität mit der Wirtszelle assoziiert ist oder ob sie in

Zu Abbildung 9a-9e:

SSV/SSAV-infizierte HF-Zellen wurden 30 Minuten lang mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mit dem Antiserum Anti-p30 immunpräzipitiert. Danach wurden die Proteine verschiedenen in vitro-Spaltungsversuchen unterzogen und die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Abbildung 9a:

- A Kontrolle, Analyse des Immunpräzipitates ohne Spaltung
- B Analyse der Proteine nach Spaltungsreifung der Vorstufen-Proteine in vivo
- C Inkubation des Immunpräzipitates mit einem Extrakt lysierter SSV/SSAV-infizierter HF-Zellen

Abbildung 9b:

- A Kontrolle
- B+C Inkubation des Immunpräzipitates mit gereinigten, lysierten SSV/SSAV-Partikeln für eine Dauer von 8 Stunden. Gesamtmenge an Virus-Protein: 75 μg (B) bzw. 150 μg (C)

Abbildung 9c:

- A Kontrolle
- B+C Inkubation des Immunpräzipitates mit gereinigten, lysierten SSV-Partikeln für eine Dauer von 8 Stunden bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen im Spaltungsansatz
- B 0.01 M NaCl C 0.15 M NaCl

Abbildung 9d:

- A Kontrolle
- B Inkubation des Immunpräzipitates mit gereinigten, lysierten SSV-Partikeln für eine Dauer von 8 Stunden
- C wie B bei Zugabe von 3 mM PMSF zum Spaltungsansatz
- D wie B bei Zugabe von 1 mM PCMB zum Spaltungsansatz

Abbildung 9e:

- A Kontrolle
- B Inkubation des Immunpräzipitates mit gereinigten, lysierten SSV-Partikeln für eine Dauer von 8 Stunden
- C wie B bei Zugabe von 100 μg Oligopeptid A (vgl. Abb. 8c)
- D wie B bei Zugabe von 100 μg Oligopeptid B (vgl. Abb. 8c)

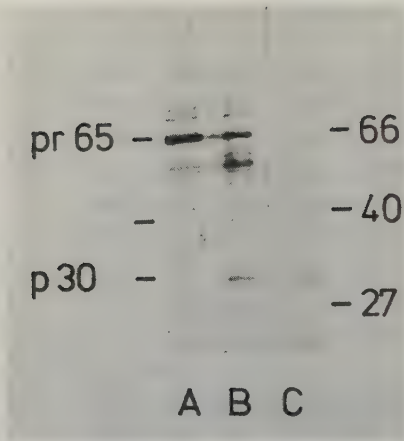


Abbildung 9a:

Vergleich der Spaltungsreifung des Vorstufen-Proteins in vivo mit der in vitro-Spaltung durch ein Extrakt lysierter SSV/SSAV-infizierter HF-Zellen

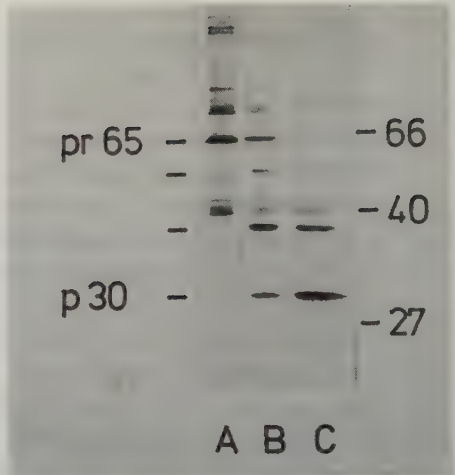


Abbildung 9b:

In vitro-Spaltung des isolierten Vorstufen-Proteins pr65 durch Zugabe gereinigter, lysierter SSV/SSAV-Partikel

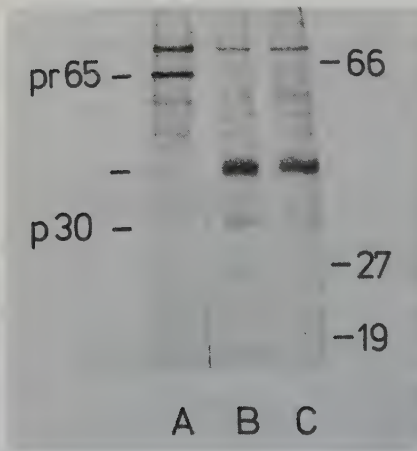


Abbildung 9c:

In vitro-Spaltung des isolierten Vorstufen-Proteins pr65 durch Zugabe gereinigter, lysierter SSV/SSAV-Partikel bei unterschiedlicher Salzkonzentration im Spaltungsansatz

gereinigten Viruspartikeln nachweisbar ist. Letzteres trifft für die beschriebenen proteolytischen Faktoren der Hühner- und Mäuse-Oncorna-Viren zu, die mit gereinigten Viruspartikeln assoziiert sind (vgl. 2.3.). Hingegen sind bei den Picorna-Viren sowohl zelluläre als auch virale Proteasen an der Spaltungsreifung der Vorstufen-Proteine des Virus beteiligt.

Um diese Frage für das SSV/SSAV zu klären, wurden SSV/SSAV-Partikel gereinigt, lysiert und mit durch Immunpräzipitation isoliertem, radioaktiv markiertem pr65 inkubiert (vgl. 3.7.2.). Das Ergebnis ist in Abbildung 9b gezeigt.

Isoliertes pr65 wurde 8 Stunden in Spaltungspuffer ohne Zusatz von Viruspartikeln (Spur A), bzw. nach Zugabe gereinigter, lysierter SSV/SSAV-Partikel (Spur B und C) inkubiert. In Spur B wurde eine Gesamtmenge von ungefähr 75 µg, in Spur C von ungefähr 150 µg Protein zugesetzt, die ein Gemisch aus den verschiedenen Proteinen des SSAV enthielt.

Das Ergebnis dieses Spaltungsansatzes zeigt, daß der gesuchte proteolytische Faktor mit den SSV/SSAV-Partikeln assoziiert ist. Das Vorstufen-Protein pr65 wurde gespalten, die bereits beschriebenen Proteine von 38000 und 30000 d entstanden als Produkte dieser Spaltung. Außer dem p38 und p30 wurde in diesem Experiment auch p52, das dritte Spaltprodukt der Spaltungsreifung in der Wirtszelle, gebildet.

In beiden Spaltungsansätzen (Spur B und C) entstanden identische Spaltprodukte, jedoch in unterschiedlichem

Verhältnis zueinander. Nicht nur die quantitative Effizienz der Spaltung sondern auch die Qualität der entstehenden Spaltprodukte war also abhängig von der Konzentration des proteolytischen Faktors. Während nach der Spaltung mit einer Menge von 75 µg Virusprotein eine gewisse Menge ungespaltenes pr65 sowie das p52 und p30, insbesondere aber sehr viel p38 nachweisbar waren, war das pr65 bei Verdoppelung der Konzentration des proteolytischen Faktors fast vollständig verschwunden. Auch die Intensität der p38-Bande war in diesem Ansatz vermindert. Dafür wurde jetzt hauptsächlich das p30 gebildet. Das Protein p30 scheint demnach ein Endprodukt der Spaltung des pr65 mit dem SSV/SSAV-assoziierten proteolytischen Faktor zu sein, während es sich beim p52 und p38 vermutlich um Intermediate dieser Spaltung handelt.

Die Untersuchungen zeigen, daß, wie bei den Hühner- und Mäuse-Oncorna-Viren, auch beim Affen-Sarkom-Virus SSV/SSAV eine proteolytische Aktivität existiert, die das Vorstufen-Protein des SSAV spaltet und daß dieser proteolytische Faktor mit den gereinigten Viruspartikeln assoziiert ist. Da die Präparation von SSV/SSAV-Partikeln stets einen 10-100fachen Überschuß an Helfervirus SSAV enthält, muß man annehmen, daß der proteolytische Faktor mit dem Helfervirus assoziiert ist. Um dies zu prüfen, wurde eine Viruspräparation durchgeführt, die allein das Helfervirus SSAV, jedoch keine transformierenden SSV/SSAV-Partikel enthielt. Die gereinigten SSAV-Partikel wurden lysiert und mit isoliertem, radioaktiv markiertem pr65 inkubiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 9c dargestellt.

In Spur A wurde isoliertes pr65 nach 8 Stunden Inkubation ohne Zugabe von Virusprotein, in Spur B und C nach

Zugabe gereinigter, lysierter SSAV-Partikel in einer Konzentration von 150 µg Virusprotein pro Spaltungsansatz aufgetragen. Zusätzlich wurde in diesem Versuch auch noch der Effekt einer erhöhten Salzkonzentration auf die Spaltung geprüft. In Spur A und B beträgt die Salzkonzentration im Spaltungsansatz 0.01 M NaCl, in Spur C 0.15 M NaCl.

Bei der Spaltung mit gereinigten SSAV-Partikeln fand sich ein Muster, das der Spaltung mit lysierten Zellen und mit gereinigten SSV/SSAV-Partikeln entsprach. Die proteolytische Aktivität ist demnach, wie erwartet, mit dem Helfervirus SSAV assoziiert.

Die Salzkonzentration schien auf diese Spaltung keinen Einfluß zu haben. Im Gegensatz zum Mäuse-Leukämie-Virus, bei dem durch Erhöhung der Salzkonzentration auf 0.08-0.1 M NaCl die Spaltung des Vorstufen-Proteins um 90% vermindert wird (Yoshinaka und Luftig, 1981), bewirkte bei der SSAV-assoziierten Spaltung sogar eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 0.15 M NaCl keine Änderung der Effektivität dieser Spaltung.

4.3.4.2. Charakterisierung des SSAV-assoziierten proteolytischen Faktors

Der proteolytische Faktor des SSAV soll im folgenden näher untersucht und mit den beschriebenen Proteasen anderer Tumoviren verglichen werden.

Beim Mäuse-Leukämie-Virus gehört die mit dem Virus assoziierte proteolytische Aktivität zu der Klasse der

Serin-Proteasen (Yoshinaka und Luftig, 1977c), wohingegen die proteolytischen Faktoren des Hühner-Oncorna-Virus und des Mamma-Tumor-Virus der Maus nicht zu den Serin-Proteasen zählen. Sie weisen Ähnlichkeiten mit der Klasse der Thiol-Proteasen auf, stimmen aber nicht in allen Parametern mit den Thiol-Proteasen überein (Dittmar und Mölling, 1978; Sen et al., 1980). Durch Zugabe von Inhibitoren, die auf die Zugehörigkeit einer Protease zu der Klasse der Thiol- bzw. Serin-Proteasen hinweisen, soll für den proteolytischen Faktor des SSAV eine Ähnlichkeit zu einer Gruppe von Proteasen überprüft werden.

Isoliertes, radioaktiv markiertes Vorstufen-Protein pr65 wurde mit SSAV-assoziiierter proteolytischer Aktivität inkubiert. Zu den Spaltungsansätzen wurde der Inhibitor der Serin-Proteasen PMSF in einer Endkonzentration von 3 mM, bzw. der Inhibitor der Thiol-Proteasen PCMB in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt (vgl. 3.7.2.). In Abbildung 9d zeigt Spur A die Kontrolle, Spur B die Spaltung mit SSAV-assoziiierter Aktivität, und Spur C und D die Spaltung nach Zugabe von PMSF bzw. PCMB.

Der Versuch zeigt, daß der SSAV-assoziierte proteolytische Faktor durch Zugabe eines Inhibitors der Serin-Proteasen vollständig blockiert werden konnte, nicht jedoch durch Zugabe eines Inhibitors der Thiol-Proteasen. Nach Zusatz von PMSF entstand keines der bekannten Produkte der SSAV-assoziierten Spaltung, das pr65 blieb vollständig ungespalten. Im Gegensatz dazu unterschied sich die Spaltung nach Zusatz von PCMB nicht von der Spaltung ohne Zugabe eines Proteaseninhibitors. Der

proteolytische Faktor des SSAV gehört demnach offensichtlich, wie derjenige des Mäuse-Leukämie-Virus, zu den Serin-Proteasen.

Da die Wirkung der p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus durch Zugabe bestimmter Oligopeptide inhibiert werden kann (vgl. 2.3.) und eine geringfügige Inhibition auch bei der Spaltung des pr65 mit p15-Protease beobachtet wurde (vgl. 4.3.3.2.), soll untersucht werden, ob diese Peptide auch bei der SSAV-assoziierten Spaltung des pr65 wirksam sind.

In diesem Spaltungsansatz wurde die SSAV-assoziierte proteolytische Aktivität jeweils 15 Minuten mit Oligopeptid A bzw. B inkubiert und anschließend zu isoliertem, radioaktiv markiertem pr65 gegeben (vgl. 3.7.2.). Das Ergebnis ist in Abbildung 9e gezeigt.

Weder die Zugabe von Peptid A (Spur C), noch von Peptid B (Spur D) hatte einen Einfluß auf die SSAV-assoziierte Spaltung, wie der Vergleich zur Spaltung ohne Zugabe eines Peptids zeigt (Spur B). In allen drei Spaltungsansätzen (Spur B, C und D) verlief die Spaltung identisch. Im Gegensatz zur Spaltung mit der p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus sind diese Peptide also bei der SSAV-assoziierten Spaltung nicht wirksam.

Reinigung des proteolytischen Faktors

Um die SSAV-assoziierte proteolytische Aktivität genauer zu charakterisieren, wurde versucht, den proteolytischen Faktor zu reinigen. Das ungefähre Molekulargewicht des Faktors sollte bestimmt werden, und es sollte

untersucht werden, ob die proteolytische Aktivität, wie beim Hühner-Oncorna-Virus, einem Strukturprotein des Virus entspricht (vgl. 2.3.), oder ob sie, wie beim Mäuse-Leukämie-Virus, nicht mit den Strukturproteinen assoziiert dargestellt werden kann (Yoshinaka und Luftig, 1980).

SSV/SSAV-Partikel wurden gereinigt, lysiert und über ein Molekularsieb (p60-Säule, Bio-Rad), dem Molekulargewicht der jeweiligen Proteine entsprechend, in einzelne Fraktionen aufgetrennt (vgl. 3.6.2.). Die Fraktionen der Säule wurden mit isoliertem, radioaktiv markiertem pr65 als Substrat auf ihre proteolytische Aktivität getestet. Außerdem wurden die Fraktionen im SDS-Gel analysiert und mit Coomassie-Blau bzw. Silber angefärbt.

In Abbildung 10 ist das Ergebnis des Experiments dargestellt. Die obere Hälfte der Abbildung zeigt die gelelektrophoretische Analyse der einzelnen Fraktionen. Jede zweite der Fraktionen 15 - 35 wurde im 12.5-prozentigen Polyacrylamidgel analysiert und mit Coomassie-Blau angefärbt. Um eine bessere Auftrennung der kleineren Proteine zu gewährleisten, wurde jede dritte Fraktion ab Nummer 36 im 15-prozentigen Polyacrylamidgel analysiert. Da wegen des geringen Proteingehalts dieser Fraktionen bei der Färbung mit Coomassie-Blau keine Proteinbanden angefärbt werden konnten, wurde die empfindlichere Silberfärbung angewendet.

Die untere Hälfte der Abbildung 10 zeigt das Ergebnis der Inkubation der einzelnen Fraktionen mit isoliertem, radioaktiv markiertem pr65. Es wurde 8 Stunden inkubiert (vgl. 3.7.2.), anschließend wurden die Proben im SDS-Gel analysiert und autoradiographiert.

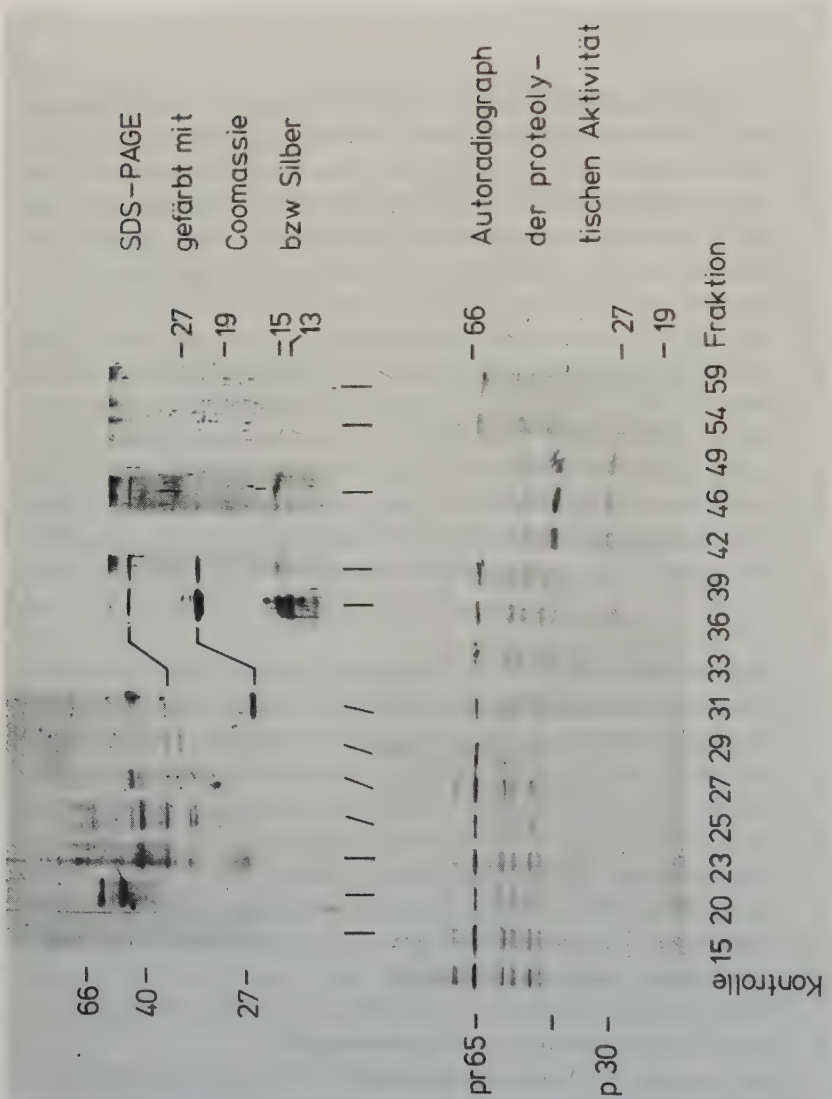


Abbildung 10:

Reinigung des proteolytischen Faktors des SSAV über ein Molekularsieb (p60-Säule). Darstellung der Proteine der einzelnen Fraktionen und Versuch der *in vitro*-Spaltung von isoliertem, radioaktiv markiertem Vorstufen-Protein pr65 durch Zugabe von Aliquots der jeweiligen Fraktionen.

Als Ergebnis dieses Spaltungsversuchs fand sich, daß die Fraktionen 41-49 eine proteolytische Aktivität enthalten, die eine Spaltung des pr65 bewirkt. Die Spaltung war vollständig, es blieb kein pr65 ungespalten und es entstanden die beschriebenen Spaltprodukte p38 und p30. Das Ergebnis dieser Spaltung entsprach also der Spaltung mit dem kompletten SSAV-Partikel. Dies beweist, daß der SSAV-assoziierte proteolytische Faktor in den genannten Fraktionen enthalten war. In allen anderen Spuren blieb das pr65 vollständig erhalten, keines der Spaltprodukte war nachweisbar.

In den Fraktionen, die eine proteolytische Aktivität besaßen, fand sich nur eine äußerst geringe Proteinmenge. Nach elektrophoretischer Auftrennung ließ sich mit Coomassie-Blau kein Protein anfärben, erst durch die hochempfindliche Silberfärbung konnte eine Proteinbande dargestellt werden. Durch Vergleich der Intensität dieser Proteinbande mit einer parallel aufgetragenen Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin ließ sich ein ungefährender Proteingehalt von 5 - 10 ng pro Fraktion abschätzen. Dies war jedoch zu wenig, um das dargestellte Protein mit biochemischen Methoden zu untersuchen. Eine größere Menge an Virusprotein zu reinigen, erschien auf Grund des bekannten niedrigen Virustiters des SSV/SSAV im Rahmen dieser Arbeit als zu aufwendig.

Das ungefähre Molekulargewicht des erwähnten Proteins wurde durch Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-Gel mit definierten Proteinen, die in parallelen Spuren aufgetragen wurden, bestimmt. Demnach hatte das gesuchte Protein eine Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-Gel, die ungefähr derjenigen der Kapsid-Proteine p15

und p12 des Hühner-Myeloblastose-Virus entsprach und die etwas langsamer als diejenige des Cytochrom C (Molekulargewicht 12400 d) war. Man darf also annehmen, daß das gesuchte Protein ein Molekulargewicht von ungefähr 10-15000 d hat.

Ob dieses Protein tatsächlich dem SSAV-assoziierten proteolytischen Faktor entspricht, konnte in diesem Experiment nicht eindeutig geklärt werden. Auch in den Fraktionen 35 - 40, die keine proteolytische Aktivität enthielten, wurde ein Protein mit gleicher Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-Gel gefunden. Allerdings enthielten diese Fraktionen vier Proteine im Bereich zwischen 10- und 15000 d. Von diesen vier Proteinen fanden sich drei in den Fraktionen 41 - 49 nicht mehr, wohingegen die eine beschriebene Proteinbande spezifisch angereichert war. Es könnte sich demnach um zwei verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Elution aus der p60-Säule, aber gleicher Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-Gel handeln. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, daß es sich in allen Fraktionen um das gleiche Protein handelt, das jedoch zum Teil in freier aktiver Form, zum anderen Teil aber mit anderen Molekülen (z.B. dem Substrat) aggregiert in inaktiver Form vorlag und deshalb in verschiedenen Fraktionen von der Säule eluiert wurde. Infolge der SDS-Denaturierung wurde diese Aggregation aufgehoben, sodaß auf dem Polyacrylamidgel identische Polypeptide erschienen.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß der proteolytische Faktor des SSAV entweder einem Protein von 10-15000 d entspricht, oder bei Auftrennung über ein Molekularsieb mit diesem Protein zusammen eluiert wird.

Mithin kann man annehmen, daß der proteolytische Faktor ebenfalls ein Molekulargewicht von 10-15000 d hat. Er liegt damit im gleichen Bereich wie die p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus und der proteolytische Faktor des Mäuse-Leukämie-Virus (Molekulargewicht: 12-20000 d, Yoshinaka und Luftig, 1980).

Ob der proteolytische Faktor des SSAV einem Strukturprotein des Virus entspricht, konnte in dieser Untersuchung aus den gleichen technischen Schwierigkeiten, die auch für die Untersuchungen beim Mäuse-Leukämie-Virus beschrieben sind, nicht geklärt werden (Yoshinaka und Luftig, 1980).

Die Untersuchungen in diesem Kapitel haben jedoch gezeigt, daß beim SSV/SSAV ebenfalls ein proteolytischer Faktor existiert, der mit dem Helfervirus SSAV assoziiert ist und der offensichtlich zu den Serin-Proteasen zählt. Der proteolytische Faktor spaltet das Vorstufen-Protein pr65 in drei Proteine, die den Spaltprodukten der Spaltungsreifung in vivo, dem p52, p38 und p30, entsprechen. Das Molekulargewicht dieses proteolytischen Faktors liegt im Bereich zwischen 10000 und 15000 d.

4.4. Untersuchungen zur Spaltung spezifischer intermediärer Vorstufen-Proteine in gereinigten SSV/SSAV-Partikeln

In den beiden vorangegangenen Kapiteln wurden die virusspezifischen Proteine aus SSV/SSAV-infizierten Zellen isoliert und die Spaltungsreifung bzw. in vitro

Spaltung dieser aus der Wirtszelle isolierten Proteine analysiert. Im folgenden soll untersucht werden, ob auch im freigesetzten Viruspartikel eine Spaltung spezifischer Proteine vor sich geht, bzw. durch Zugabe einer proteolytischen Aktivität induziert werden kann.

4.4.1. Vergleichende Darstellung der Proteine "früh" und "spät" geernteter Partikel

Nachdem in 4.2. gezeigt wurde, daß ein gewisser Teil des Vorstufen-Proteins pr65 ungespalten in die Viruspartikel eingebaut wird, soll nun die Frage geklärt werden, ob dieser Teil des pr65 innerhalb der Viruspartikel einer Spaltungsreifung unterliegt. Wenn das pr65 nach dem Zusammenbau und der Freisetzung der Viruspartikel aus der Zelle innerhalb des Partikels weiter gespalten wird, so muß man erwarten, daß in Mediumüberständen von Viruspartikel produzierenden Zellen, die früh (ungefähr 1 Stunde) nach der radioaktiven Markierung geerntet werden, eine relativ große Menge pr65 gefunden wird. Im Gegensatz dazu sollten Mediumüberstände, die 24 Stunden nach der Markierung geerntet werden, wesentlich weniger pr65 enthalten, da nach dieser Zeit das meiste Vorstufen-Protein bereits gespalten sein müßte.

SSV/SSAV-Partikel produzierende Zellen wurden für 90 Minuten radioaktiv markiert. Danach wurde frisches Nährmedium zugegeben und dreimal in je 60-minütigen Abständen geerntet. Die gesammelten Mediumüberstände wurden vereinigt und als Virus-Suspension 1 bezeichnet. Anschließend wurde frisches Nährmedium zu den Zellen

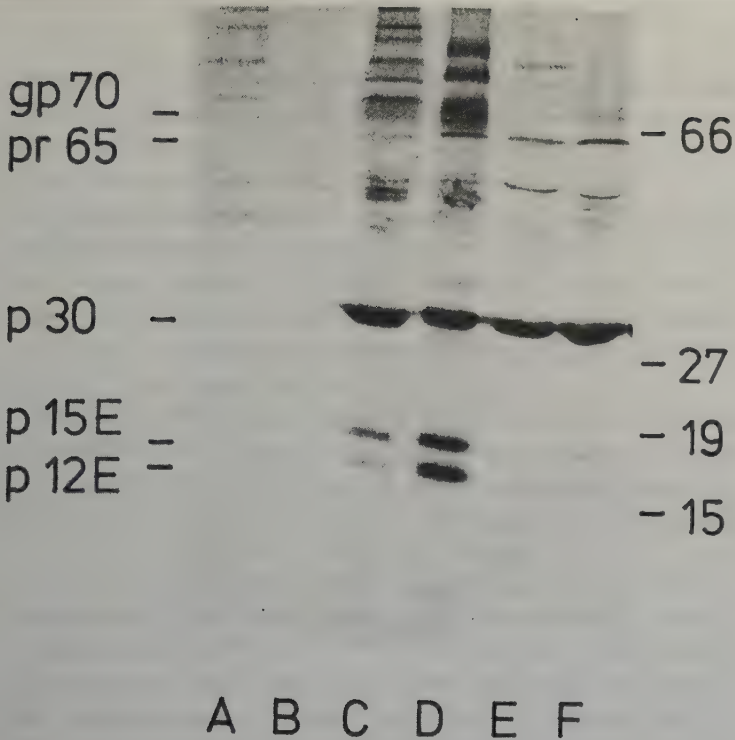


Abbildung 11:

Darstellung der spezifischen Proteine "früh" und "spät" geernteter SSV/SSAV-Partikel.

SSV/SSAV-infizierte HF-Zellen wurden 90 Minuten lang mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert. Die Mediumüberstände, die in den ersten 3 Stunden nach Markierung (Spur A, C und E) und die 24 Stunden nach Markierung (Spur B, D und F) geerntet wurden, wurden jeweils mit 3 verschiedenen Antiseren immunpräzipitiert und im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Antiseren: A+B Kontrollserum
C+D Anti-SSV
E+F Anti-p30

gegeben und 24 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Mediumüberstand geerntet und als Virus-Suspension 2 bezeichnet. Beide Suspensionen wurden pelletiert, ly-siert und immunpräzipitiert. Zur Immunpräzipitation dienten Antiseren, die gegen die gesamten Strukturpro-teine der SSV/SSAV-Partikel (Anti-SSV) bzw. gegen die Kapsid-Proteine (Anti-p30) gerichtet waren, sowie nor-males Kontrollserum. Die präzipitierten Proteine wurden im SDS-Gel analysiert und autoradiographiert.

Abbildung 11 zeigt die Analyse der Proteine. Das Immun-präzipitat von Virus-Suspension 1 und 2 mit dem jeweils gleichen Antiserum wurde jeweils in nebeneinanderlie-genden Spuren aufgetragen.

Man kann erkennen, daß in Virus-Suspension 1 und 2 qua-litativ weitgehend identische Proteine präzipitiert wurden. Die Unterschiede waren in erster Linie quanti-tativer Art und auf eine ungleiche Viruskonzentration in den beiden Suspensionen zurückzuführen. Alle be-schriebenen Strukturproteine des SSAV (vgl. 4.2.) wur-den in beiden Suspensionen in annähernd gleichem Umfang gefunden. Dasselbe galt für das Vorstufen-Protein pr65.

Aus der Untersuchung folgt, daß in den SSV/SSAV-Parti-keln weder das Vorstufen-Protein pr65 noch ein anderes SSAV-spezifisches Protein in signifikantem Ausmaß wei-ter gespalten wird. Demnach scheint eine Spaltungsrei-fung im aus der Zelle freigesetzten Viruspartikel - zu-mindest nach der ersten Stunde nach Freisetzung - nicht mehr stattzufinden.

4.4.2. In vitro-Spaltung des aus SSV/SSAV-Partikeln isolierten Vorstufen-Proteins

4.4.2.1. Inkubation ohne Zugabe einer proteolytischen Aktivität

Das in die SSV/SSAV-Partikel eingebaute Vorstufen-Protein pr65 soll im folgenden einem in vitro-Spaltungsversuch unterzogen werden. Dabei interessiert die Frage, ob durch Lysierung der Partikel eine proteolytische Aktivität frei wird, die im intakten, ungespaltenen Partikel unwirksam ist und die in der Lage ist, das Vorstufen-Protein des SSAV spezifisch zu spalten. Eine derartige proteolytische Aktivität wurde für das Mäuse-Leukämie-Virus beschrieben (Yoshinaka und Luftig, 1977b; 1977c).

SSV/SSAV-Partikel produzierende Zellen wurden radioaktiv markiert, die gesammelten Mediumüberstände pelletiert, lysiert und immunpräzipitiert (vgl. 3.5.2; 3.6.1.3.). Zur Immunpräzipitation diente das gegen die Kapsid-Proteine des SSAV gerichtete Antiserum (Anti-p30). Die Immunpräzipitate wurden im SDS-Gel analysiert und autoradiographiert.

Abbildung 12 zeigt die Analyse der Proteine. Als Kontrolle diente das Immunpräzipitat der Viruspartikel (Spur A). In Spur B - D wurden verschiedene Spaltungsansätze aufgetragen. Die lysierten Viruspartikel wurden entweder immunpräzipitiert und anschließend ohne Zugabe einer proteolytischen Aktivität 8 Stunden inkubiert (Spur B), oder aber unmittelbar nach der Lysierung ohne

Zugabe einer proteolytischen Aktivität 8 bzw 16 Stunden inkubiert und erst danach immunpräzipitiert (Spur C und D).

Nachdem bereits in 4.4.1. nachgewiesen wurde, daß das in die Partikel eingebaute pr65 in intakten Viruspartikeln keiner Spaltungsreifung unterliegt, zeigt nun dieses Experiment, daß auch das durch Immunpräzipitation aus den Partikeln isolierte Vorstufen-Protein ohne Zugabe einer proteolytischen Aktivität nicht weiter gespalten wird. Das entspricht den Ergebnissen der Untersuchung beim zellulären pr65 (vgl. 4.3.).

Es stellt sich die Frage, ob in den SSV/SSAV-Partikeln überhaupt eine proteolytische Aktivität nachweisbar ist, die eine Spaltung des in die Partikel eingebauten pr65 induzieren kann. Man muß davon ausgehen, daß eine derartige proteolytische Aktivität im intakten Viruspartikel nicht wirksam ist, da im Partikel keine Spaltungsreifung stattfindet. Im oben dargestellten Experiment wurde dieser proteolytische Faktor möglicherweise nicht erfaßt, da er unter Umständen bei der Immunpräzipitation nicht gefällt werden konnte oder nach Bindung seines Substrats, des pr65, an einen Antikörper nicht mehr aktiv war. Um diese Frage zu klären, wurden Viruspartikel unmittelbar nach der Lysierung unterschiedliche Zeiten inkubiert und erst im Anschluß an diese Inkubation immunpräzipitiert.

Nach dieser Inkubation fiel in erster Linie eine Verminderung der Gesamtmenge an radioaktiv markiertem, meßbarem Protein auf (Abbildung 12, Spur C und D). Dies ist vermutlich auf einen Verdau durch unspezifische Proteasen zurückzuführen, die in diesem Experiment aus tech-

Zu Abbildung 12-14:

SSV/SSAV-infizierte HF-Zellen wurden 90 Minuten lang mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert. Die freigesetzten Viruspartikel wurden abzentrifugiert, lysiert und mit dem Antiserum Anti-p30 immunpräzipitiert. Anschließend wurden die Immunpräzipitate verschiedenen in vitro-Spaltungsversuchen unterzogen. Die Proteine wurden im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Abbildung 12:

- A Kontrolle, Analyse des Immunpräzipitates ohne Spaltung
- B Inkubation des Immunpräzipitates ohne Zugabe einer proteolytischen Aktivität für eine Dauer von 8 Stunden
- C+D Inkubation der radioaktiv markierten, lysierten Viruspartikel für eine Dauer von 8 (C) bzw. 16 (D) Stunden und anschließende Immunpräzipitation

Abbildung 13:

- A Kontrolle
- B Inkubation des Immunpräzipitates ohne Zugabe einer proteolytischen Aktivität für eine Dauer von 8 Stunden
- C Inkubation des Immunpräzipitates mit p15-Protease für 8 Stunden

Abbildung 14:

- A-C wie in Abb. 13
- D Inkubation des Immunpräzipitates mit gereinigten, lysierten SSAV-Partikeln für 8 Stunden

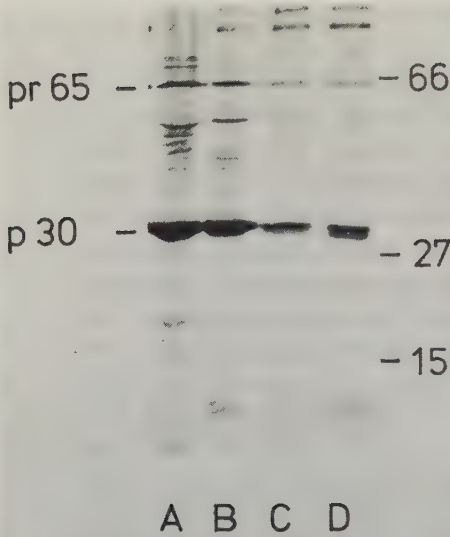


Abbildung 12:
Inkubation gereinigter, lysierter SSV/SSAV-Partikel ohne Zugabe einer proteolytischen Aktivität

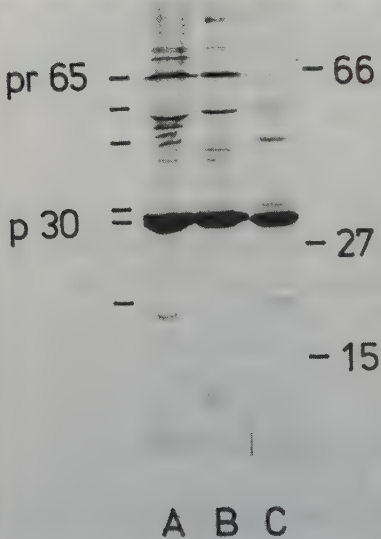


Abbildung 13:
in vitro-Spaltung der Vorstufen-Proteine gereinigter SSV/SSAV-Partikel mit der p15-Protease des Hühner-Onconoma-Virus

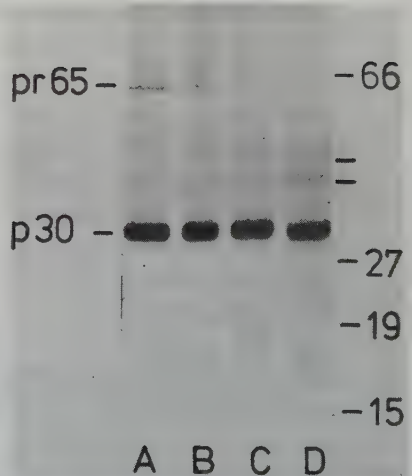


Abbildung 14:
In vitro-Spaltung der Vorstufen-Proteine gereinigter SSV/SSAV-Partikel mit p15-Protease bzw. dem proteolytischen Faktor des SSV

nischen Gründen vorhanden waren. Da die Intensität aller Proteinbanden in diesem Experiment in annähernd gleichem Umfang vermindert war, kann man davon ausgehen, daß keine spezifische Spaltung eines Proteins stattgefunden hat. Insbesondere spricht dafür auch, daß nach der Inkubation keine Proteinbande neu auftauchte, die als Produkt dieser Spaltung angesehen werden könnte. Die Dauer der Inkubation hatte keinen Einfluß auf das Ergebnis.

Das Experiment zeigt, daß das pr65 der Viruspartikel auch nach Lysierung der Partikel und nachfolgender Inkubation nicht gespalten wurde. Im Gegensatz dazu wird beim Mäuse-Leukämie-Virus durch Lysierung der Viruspartikel eine proteolytische Aktivität frei, die die Spaltung des in den Partikeln vorhandenen Vorstufen-Proteins induziert (Yoshinaka und Luftig, 1977b; 1977c). Diese Spaltung ist vollständig, und die entstehenden Spaltprodukte können nachgewiesen werden. Man muß demnach annehmen, daß in den SSV/SSAV-Partikeln eine entsprechende proteolytische Aktivität entweder fehlt oder in so geringer Konzentration vorhanden ist, daß sie im vorliegenden Experiment nicht nachgewiesen werden kann.

Eine weitere Möglichkeit wäre, daß das in die Viruspartikel eingebaute pr65 auch nach Lysierung der Partikel nicht in freier Form vorliegt und deshalb nicht für einen proteolytischen Faktor zugänglich ist oder daß es sich um ein qualitativ unterschiedliches pr65 handelt, das nicht durch den proteolytischen Faktor gespalten werden kann.

4.4.2.2. Spaltung mit p15-Protease

Um zu untersuchen, ob das in die Viruspartikel eingebaute Vorstufen-Protein pr65 entsprechend dem aus der Wirtszelle isolierten pr65 spaltbar ist, wurde es einem in vitro-Spaltungsversuch mit der p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus unterzogen.

SSV/SSAV-Partikel wurden, wie in 4.4.2.1. beschrieben, radioaktiv markiert und immunpräzipitiert. Die Proteine wurden im SDS-Gel analysiert und autoradiographiert.

In Abbildung 13 zeigt Spur A die Kontrolle, das Immunpräzipitat der Viruspartikel, in Spur B und C wurden die beiden Spaltungsansätze aufgetragen. Das isolierte pr65 wurde ohne (Spur B) und mit (Spur C) Zugabe von p15-Protease 8 Stunden inkubiert (vgl. 3.7.1.).

Das Ergebnis macht deutlich, daß auch das in die Viruspartikel eingebaute pr65 mit p15-Protease vollständig spaltbar war, wohingegen es ohne Zugabe einer proteolytischen Aktivität nicht gespalten wurde. Als Spaltprodukte entstanden vier Proteine mit einem Molekulargewicht von ungefähr 52000, 40000, 32000 und 20000 d. Die ersten drei Proteine entsprechen den Spaltprodukten bei der p15-Spaltung des aus der Wirtszelle isolierten pr65 (vgl. 4.3.3.2.). Ob auch das vierte Produkt der p15-Spaltung des aus der Wirtszelle isolierten Vorstufen-Proteins pr65, das p30, bei der hier beschriebenen Spaltung entstand, konnte nicht nachgewiesen werden, da in SSV/SSAV-Partikeln stets eine große Menge des Strukturproteins p30 vorhanden ist (vgl. 4.2.). Das bei der hier dargestellten Spaltung gebildete Protein mit einem Mo-

lekulargewicht von 20000 d wurde bei der Spaltung des aus der Wirtszelle isolierten pr65 nicht gefunden.

Im Gegensatz zur p15-Spaltung des aus der Wirtszelle isolierten pr65, bei der überwiegend p52 entsteht, wurde bei der p15-Spaltung des in die Viruspartikel eingebauten pr65 nur eine geringe Menge p52 gebildet. Hier entstanden überwiegend die Proteine von 40000, 32000 und 20000 d. Möglicherweise handelt es sich also um zwei qualitativ unterschiedliche Formen des pr65.

4.4.2.3. Spaltung mittels SSV/SSAV-assoziiierter proteolytischer Aktivität

In diesem Experiment soll die Frage geklärt werden, ob das durch Immunpräzipitation aus den Viruspartikeln isolierte Vorstufen-Protein pr65 durch die beschriebene SSAV-assoziierte proteolytische Aktivität (vgl. 4.3.4.) in vitro gespalten werden kann. Wie in 4.4.2.1. gezeigt, findet auch nach Lysierung der Partikel ohne Zugabe einer proteolytischen Aktivität keine nachweisbare Spaltung des pr65 statt. Falls dies auf einer zu geringen Konzentration des proteolytischen Faktors in den Viruspartikeln beruht, sollte durch Zugabe des SSAV-assoziierten proteolytischen Faktors eine Spaltung des pr65 induziert werden können. Ist das in die Viruspartikel eingebaute pr65 hingegen mit dem SSAV-assoziierten proteolytischen Faktor überhaupt nicht spaltbar, so dürfte auch eine Zugabe dieses Faktors keine Änderung des Ergebnisses bewirken.

SSV/SSAV-Partikel wurden, wie in 4.4.2.1. beschrieben, radioaktiv markiert und immunpräzipitiert. Die Proteine wurden im SDS-Gel analysiert und autoradiographiert.

Abbildung 14 zeigt in Spur A die Kontrolle, das Immunpräzipitat der Viruspartikel. In Spur B - D wurden die verschiedenen Spaltungsansätze aufgetragen. Das aus den Viruspartikeln isolierte pr65 wurde ohne Zugabe einer proteolytischen Aktivität (Spur B), nach Zugabe von p15-Protease des Hühner-Onconoma-Virus (Spur C), bzw. nach Zugabe des SSAV-assoziierten proteolytischen Faktors (Spur D; vgl. 3.7.2.) 8 Stunden inkubiert.

Der Versuch beweist, daß das in die Viruspartikel eingebaute pr65 ebenso wie das aus der Wirtszelle isolierte pr65 mit dem SSAV-assoziierten proteolytischen Faktor spaltbar ist. Durch Zugabe dieses Faktors konnte eine vollständige Spaltung des aus den Viruspartikeln isolierten pr65 induziert werden. Als eines der dabei entstehenden Spaltprodukte wurde ein Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 38000 d gefunden, das vermutlich dem p38 entspricht, das bei der Spaltung des aus der Wirtszelle isolierten pr65 entstand (vgl. 4.3.4.). Dieses Protein, das im Original als schwache Proteinbande bei 38000 d zu sehen ist, ist in der Reproduktion schlecht erkennbar und wurde deshalb am Bildrand markiert. Da in den Viruspartikeln nur eine sehr geringe Konzentration an pr65 vorliegt, ist auch nur eine äußerst geringe Menge an Spaltprodukten zu erzielen. Aus diesem Grund konnte auch nicht geklärt werden, ob in diesem Spaltungsansatz weitere Spaltprodukte entstanden.

5. DISKUSSION

Nur eine genaue Kenntnis der Vorgänge, die bei der Replikation und Freisetzung onkogener Retroviren aus transformierten Zellen ablaufen, kann die Voraussetzungen dafür schaffen, die Vermehrung des infektiösen Virus und die Verbreitung seines onkogenen Potentials zu verhindern. Von zentraler Bedeutung für das Verständnis der Replikation der Retroviren ist dabei die Frage, wie die Proteine des Virus in der Wirtszelle synthetisiert und modifiziert werden und welche Interaktionen zwischen den Virus-Proteinen und der Wirtszelle bestehen. Die Untersuchung dieser Frage sollte es ermöglichen, ein Modell für die Bildung und Reifung der Strukturproteine eines Virus aufzustellen, wie es z.B. für das Rous-Sarkom- und das Poliovirus beschrieben ist.

Nach Infektion der Zelle mit dem Poliovirus wird der größte Teil der Virus-RNS zu einem großen Polyprotein translatiert, das alle bisher bekannten Poliovirus-spezifischen Proteine enthält. Dieses Polyprotein wird vermutlich in statu nascendi, entweder durch eine zelluläre Protease oder durch autokatalytischen Zerfall, in drei verschiedene Vorstufen-Proteine gespalten. Im weiteren Verlauf unterliegen die Vorstufen-Proteine dann einer zweiten proteolytischen Spaltung, wobei alle bekannten Proteine des Poliovirus entstehen. Diese zweite Spaltung wird durch eine Virus-kodierte Protease induziert.

Wie bereits in Kapitel 2 erwähnt, sind auch bei den Retroviren eine Reihe von Einzelheiten über die Synthese und Modifizierung der Virus-Proteine bekannt. Bei den Retroviren erfolgt die Transkription des integrierten Virusgenoms durch zelluläre DNS-abhängige RNS-Polymerasen, wobei die einzelnen Gene für großmolekulare Vorstufen-Proteine kodieren. Diese Vorstufen-Proteine gehen im weiteren Verlauf durch Spaltungsreifung in die endgültigen Strukturproteine des Virus über und bilden zusammen mit der Virus-RNS neue Viruspartikel.

Der Vorgang der Spaltungsreifung ist bisher nur teilweise untersucht. Verschiedene Untersuchungen sprechen dafür, daß auch bei den Retroviren, wie beim Poliovirus, die Spaltungsreifung der Vorstufen-Proteine zum Teil durch Virus-kodierte Proteasen induziert wird (vgl. 2.3.). Es ist jedoch bisher nicht bekannt, ob diese Spaltungsreifung bei allen Retroviren und für alle Vorstufen-Proteine nach dem gleichen Muster abläuft. Weiterhin ist noch ungeklärt, ob auch bei den Retroviren eine Spaltung der Vorstufen-Proteine durch zelluläre Proteasen oder ein autokatalytischer Zerfall dieser Vorstufen vorkommt.

Wie in Kapitel 2 ausgeführt, wurden die genannten Probleme bisher nur bei Retroviren der Geflügel und niederen Säugetiere partiell untersucht. Bei Primaten-Viren fehlen derartige Untersuchungen bisher vollständig. Sie schaffen die Voraussetzungen dafür, ein Modell des Replikationszyklus eines Primaten-Retrovirus und in der Folge vielleicht eines humanen Retrovirus zu erstellen und auf dieser Basis möglicherweise spezifische Inhibitoren der Replikation zu finden.

5.1. Spaltung der Vorstufen-Proteine des SSV/SSAV
in vivo

Zu Beginn der Untersuchung wurden zunächst die SSV/SSAV-spezifischen Proteine in der Wirtszelle und in den Viruspartikeln identifiziert und die verwendeten Zellen charakterisiert.

Dabei zeigte sich, daß die als SSV/SSAV-spezifisch bekannten Strukturproteine der SSV/SSAV-Pseudotyp-Partikel (vgl. Deinhardt et al., 1978; 1980; Aaronson et al., 1976; Bergholz, 1981) nur bei Vorhandensein und Expression des SSAV-Genoms gebildet werden. In Zellen, die ausschließlich mit dem SSV infiziert und transformiert sind, die aber das Genom des Helfervirus SSAV nicht enthalten, wurde kein partikelspezifisches Protein nachgewiesen. In diesen Zellen werden auch keine Viruspartikel gebildet und freigesetzt ("Non producer" = NP-Zellen, vgl. Bergholz et al., 1977). Die bekannten Strukturproteine der SSV/SSAV-Partikel werden also ausschließlich vom SSAV-Helfervirus bereitgestellt. Sie sind für die Replikation des Virus notwendig, nicht aber für die Transformation der Zelle verantwortlich.

Durch die genannten Untersuchungen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß in der SSV-transformierten NP-Zelle ein Fusionsprotein aus Teilen des gag- und pol-Gens und aus dem sis-Onkogen gebildet wird. Derartige Fusionsproteine finden sich u.a. beim Abelson Mäuse-Leukämie-Virus (Witte et al., 1978), beim Myelocytomatose-Virus der Geflügel (MC 29; Bister et al., 1977) und beim Hühner-Erythroblastose-Virus (Hayman et al., 1979). Die Annahme eines Fusionsproteins aus gag-, pol-

und sis-Sequenz ist auch mit den Ergebnissen der Klonierungsversuche des SSV-Genoms vereinbar (Germann et al., 1982). Ein derartiges Protein könnte mit dem p115 identisch sein, das als mögliches primäres Translationsprodukt des SSV-Genoms beschrieben wurde (Born et al., 1982) und das in der vorliegenden Untersuchung als einziges SSV-spezifisches Protein in der NP-Zelle gefunden wurde. Die Annahme, daß in der NP-Zelle ein Protein entsteht, das Teile der gag- und pol-Sequenz enthält, wurde auch durch eine andere Untersuchung gestärkt. In dieser Untersuchung wurden in einer von der beschriebenen Zelle unterschiedenen NP-Zelle geringe Mengen von gag-Proteinen des SSAV gefunden (Thiel et al., 1981a; 1982). Man kann jedoch davon ausgehen, daß ein eventuelles Fusionsprotein nicht die Antigenität des größten gag-Proteins p30 besitzt, da es in der vorliegenden Untersuchung mit einem gegen p30 gerichteten Antiserum nicht präzipitiert werden konnte. Zur endgültigen Klärung der Frage müßte eine Immunpräzipitation der NP-Zelle mit monospezifischen Antisera durchgeführt werden, die gegen die kleinen gag-Proteine p15, p12 und p10 gerichtet sind. Derartige Antisera stehen jedoch augenblicklich nicht zur Verfügung.

In Übereinstimmung mit anderen Untersuchern (Deinhardt et al. 1978; 1980; Bergholz, 1981) wurden die bekannten SSAV-spezifischen Proteine sowohl in SSV/SSAV- und SSAV-infizierten Zellen als auch in den freigesetzten Viruspartikeln nachgewiesen. Im einzelnen wurden die Glykoproteine der äußeren Hülle und insbesondere die Strukturproteine des Nukleokapsids untersucht.

Bei der Analyse der Glykoproteine des SSAV wurde insbesondere der Frage nachgegangen, ob beim SSAV ein gemein-

sames Vorstufen-Protein der Glykoproteine existiert. Im Gegensatz zu einer anderen Untersuchung, bei der ein Vorstufen-Protein der Glykoproteine (pr80 env) noch nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden nachgewiesen wurde (Bergholz, 1981), konnte in der hier vorliegenden Arbeit ein derartiges Vorstufen-Protein auch bei äußerst kurzer Markierungszeit nicht gefunden werden. Hingegen wurde bereits nach kurzer Markierungszeit das große Glykoprotein gp70 sowie ein Protein von 27000 d gefunden. Bei diesem bisher nicht beschriebenen Protein könnte es sich um ein Vorstufen-Protein für den Komplex p15E/p12E handeln, da es bei längerer Inkubation verschwand und dafür p15E/p12E auftauchte. Ein großmolekulares Vorstufen-Protein, aus dem sowohl das gp70 als auch das Protein von 27000 d hervorgehen, wird in der hier verwendeten Zelle entweder nicht synthetisiert oder aber so außergewöhnlich schnell gespalten, daß es bereits nach Puls-Markierung nicht mehr nachweisbar ist. Möglicherweise wird dieses Vorstufen-Protein unmittelbar nach der Translation bereits weiter gespalten.

Die Analyse der Strukturproteine des viralen Kapsids betraf in erster Linie das größte Kapsid-Protein, das p30, das ca. 30% des Gesamtproteins der Viruspartikel ausmacht. Das p30 entsteht in der SSV/SSAV-infizierten Zelle durch Spaltungsreifung aus dem Vorstufen-Protein pr65 (Bergholz, 1981; Konze-Thomas und von der Helm, 1981). Außer dem p30 entstehen noch zwei weitere Proteine als Produkte bei der Spaltungsreifung des pr65, das p52 und das p38. Ein kleiner Teil des pr65 bleibt auch bei längerer Inkubation in der Wirtszelle stets ungespalten. Dieses ungespaltene pr65 wird möglicherweise

in die Viruspartikel eingebaut, denn in gereinigten SSV/SSAV-Partikeln findet sich stets eine gewisse Menge pr65, das anscheinend nicht weiter gespalten wird. Ähnlich liegen die Verhältnisse beim Mäuse-Leukämie-Virus, bei dem stets ungespaltenes Vorstufen-Protein in die Viruspartikel eingebaut wird (Jamjoom et al., 1975). Das ungespaltene Vorstufen-Protein findet sich dabei überwiegend in einer bestimmten Fraktion der Viruspartikel, die als "Unreife Kerne" bezeichnet wird (Yoshinaka und Luftig, 1977a). Beim Mäuse-Leukämie-Virus werden im Verlauf des Replikationszyklus zunächst "Unreife Kerne" gebildet, die sich morphologisch von "Reifen Kernen" unterscheiden und in denen das Vorstufen-Protein über 50% der gesamten Strukturproteine ausmacht. Durch Spaltungsreifung des Vorstufen-Proteins gehen die "Unreifen Kerne" in "Reife Kerne" über (Yoshinaka und Luftig, 1978). "Unreife Kerne" scheinen also Vorstufen der "Reifen Kerne" zu sein.

Möglicherweise hat das in die Viruspartikel eingebaute Vorstufen-Protein beim SSV/SSAV eine ähnliche Funktion wie beim Mäuse-Leukämie-Virus. Die Frage, warum ein Teil des Vorstufen-Proteins pr65 gespalten wird, der andere Teil jedoch nicht, wird in Kapitel 5.2 bei der in vitro-Spaltung des pr65 diskutiert.

Wie bereits erwähnt, entstehen bei der Spaltungsreifung des pr65 die drei Produkte p30, p38 und p52. Alle drei genannten Proteine konnten mit einem gegen das p30 gerichteten Antiserum immunpräzipitiert werden. Dagegen können die kleineren Kapsid-Proteine p15 und p12 mit diesem Antiserum nicht präzipitiert werden. Mithin kann man davon ausgehen, daß die beiden Proteine p52 und p38

vermutlich intermediäre Vorstufen-Proteine des p30 sind, da sie offensichtlich das p30 enthalten. Daraus ergibt sich die Frage, warum diese intermediären Vorstufen bei längerer Inkubation nicht vollständig zu den endgültigen Strukturproteinen gespalten werden, sondern in der Wirtszelle kumulieren. Offensichtlich ist also die Bildung dieser Proteine effektiver als ihre weitere Spaltung. Dies könnte durch eine unterschiedliche Affinität der Proteasen zu den verschiedenen Spaltstellen des Substrates bzw. durch die Annahme verschiedener Proteasen mit unterschiedlicher Spaltstellen-Spezifität erklärt werden. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß das p52 und p38 eine notwendige Funktion in der infizierten Zelle erfüllen und deshalb nicht vollständig gespalten werden können. Diese Funktion wäre allerdings auf die Wirtszelle beschränkt, da die beiden Proteine in den Viruspartikeln nicht nachweisbar sind.

Aus der Tatsache, daß bei der Spaltungsreifung des pr65 zwei verschiedene Zwischenstufen auftreten, die beide das Strukturprotein p30 enthalten, ergibt sich, daß entweder diese beiden Intermediate in verschiedenen Stadien der Spaltungsreifung entstehen oder aber beim SSAV zwei alternative Wege der Spaltungsreifung der Kapsid-Proteine bestehen. Wenn man für das pr65 des SSAV die gleiche Anordnung der Kapsid-Proteine wie beim Mäuse-Leukämie-Virus annimmt, nämlich NH₂-p15-p12-p30-p10-COOH (Bergholz, 1981), so kann man davon ausgehen, daß das p52 die Kapsid-Proteine p15, p12 und p30 enthält, das p38 die Proteine p30 und p10. Die beiden Intermediate können demnach nicht durch Spaltung an derselben Spaltstelle entstehen. Mithin muß man annehmen, daß beim SSAV zwei alternative Wege der Spaltungsreifung

des pr65 in vivo bestehen. Ähnliches wurde für die in vitro-Spaltung des Vorstufen-Proteins des Mäuse-Sarkom-Virus mit dem proteolytischen Faktor des Mäuse-Leukämie-Virus beschrieben. Bei dieser Spaltung wurden zwei verschiedene Intermediate gefunden, die als pr55 gag und als pr40 gag bezeichnet wurden (Yoshinaka und Luftig, 1982). Das pr55 gag, das nur bei der in vitro Spaltung, nicht jedoch bei der Spaltungsreifung in vivo gefunden wurde, enthält die Kapsid-Proteine p15, p12 und p30. Das pr40 gag, das auch bei der Spaltungsreifung in vivo als Intermediat gebildet wird, enthält das p30 und das p10. Sie entsprechen damit den oben beschriebenen Proteinen des SSAV. Beide Wege der Spaltung führen im weiteren Verlauf zur Bildung der 4 Kapsid-Proteine des Virus.

Im Gegensatz zur in vitro-Spaltung des Vorstufen-Proteins beim Mäuse-Sarkom-Virus, bei der vorwiegend pr40 gag und nur sehr wenig pr55 gag gebildet wird (Yoshinaka und Luftig, 1982), verläuft die Spaltungsreifung des pr65 beim SSAV in erster Linie über das p52. Das p38 entsteht in erheblich geringerem Umfang.

Man kann also davon ausgehen, daß beim SSAV ein Hauptweg der Spaltungsreifung des Vorstufen-Proteins pr65 besteht, bei dem zunächst das Kapsid-Protein p10 abgespalten wird und ein intermediäres Vorstufen-Protein, das p52, entsteht. Dieses p52 wird im weiteren Verlauf teilweise zu den endgültigen Kapsid-Proteinen gespalten, teilweise jedoch bleibt es ungespalten in der Wirtszelle. Bei dem alternativen Spaltungsweg wird vom pr65 zunächst das p38 abgespalten, das aus p30 und p10 besteht. Im weiteren Verlauf entstehen dann ebenfalls die endgültigen Strukturproteine des Virus.

5.2. In vitro Spaltung des Vorstufen-Proteins des
 SSV/SSAV

Um die zwei verschiedenen Wege der Spaltungsreifung des pr65, die Spaltprodukte und die Spaltstellen näher zu charakterisieren, wurde versucht, das pr65 in vitro zu spalten. Als proteolytisches Agens wurde zum einen die p15-Protease der Hühner-Oncorna-Viren verwendet, von der bekannt ist, daß sie Vorstufen-Proteine verschiedener Retroviren in vitro spalten kann (vgl. 2.3.). Zum anderen wurde versucht, das pr65 mit dem proteolytischen Faktor des SSAV (Beschreibung und Diskussion des Faktors: vgl. 5.3.) zu spalten. Als Substrat für die in vitro-Spaltungsversuche diente pr65, das aus der infizierten Zelle bzw. aus gereinigten Viruspartikeln mittels Immunpräzipitation isoliert worden war.

Spaltet man das aus der infizierten Zelle isolierte pr65 in vitro mit der p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus, entsteht hauptsächlich p52. Dieses p52 stimmt mit dem in der Wirtszelle gefundenen p52 bei Auftrennung in zwei voneinander unabhängigen Gelelektrophorese-Systemen überein, sodaß man davon ausgehen kann, daß es sich um identische Proteine handelt. Das gleiche gilt für das ebenfalls bei der p15-Spaltung des pr65 entstehende p30. Dieses Protein entsteht jedoch nur in äußerst geringem Umfang. Dagegen wird das p38 bei der p15-Spaltung des pr65 überhaupt nicht gebildet. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus zwar die Spaltung an der Spaltstelle zwischen p30 und p10, bei der p52 entsteht, induzieren kann (vgl. Abbildung 15a), nicht jedoch die Spaltung an der Spaltstelle zwischen p12 und p30, bei der p38 entsteht (vgl.

Abbildung 15b). Dies entspricht den Verhältnissen beim Mäuse-Leukämie-Virus, bei dem ebenfalls die Spaltstelle p12/p30 nicht mit der p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus gespalten werden kann, im Gegensatz zu den anderen Spaltstellen (Yoshinaka und Luftig, 1982).

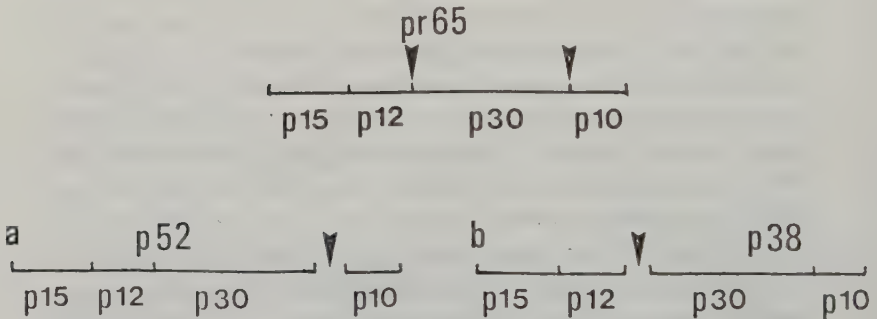


Abbildung 15: Modell der Spaltung des Vorstufen-Proteins pr65 an zwei verschiedenen Spaltstellen und der entstehenden Spaltprodukte. Die jeweiligen Spaltstellen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Außer den Produkten, die auch bei der Spaltungsreifung in der Wirtszelle gefunden wurden, entstehen bei der in vitro-Spaltung des pr65 mit der p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus zwei Proteine, die in vivo nicht gebildet werden. Diese Proteine haben ein Molekulargewicht von ungefähr 40000 d (p40) bzw. 32000 d.

Wie erwähnt, wird ein Teil des pr65 in der Wirtszelle nicht gespalten sondern vermutlich ungespalten in die Viruspartikel eingebaut. Dieser Teil des pr65 wird beim in vitro-Spaltungsversuch mit der p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus praktisch ausschließlich zu p40 gespalten, es entsteht kein p52. Möglicherweise besteht bei diesem Teil des pr65 ein Defekt der Spaltstelle p30/p10, sodaß p52 nicht gebildet werden kann.

Die in vitro-Spaltung zu p40, die in vivo nicht vorkommt, wird erst bei höherer Salzkonzentration im Spaltungsansatz effektiv. Außerdem ist diese Spaltstelle durch Zugabe eines Oligopeptids kompetitiv inhibierbar, das eine ähnliche Aminosäuresequenz hat wie die Spaltstellen des Vorstufen-Proteins beim Rous-Sarkom-Virus (vgl. 2.3.; von der Helm, 1983). Demnach scheint die Spaltstelle beim pr65, die zur Entstehung des p40 führt, eine ähnliche Aminosäuresequenz zu haben wie die Spaltstellen beim Rous-Sarkom-Virus. Durch Erhöhung der Salzkonzentration im Spaltungsansatz wird die Sekundärstruktur des pr65 möglicherweise geglättet, in der Folge wird die Aminosäuresequenz (Primärstruktur) allein entscheidend sein für die Spaltung, und die p15-Protease des Hühner-Oncorna-Virus erkennt die für diese Protease typische Sequenz. Im Gegensatz zur Bildung des p40 ist die Entstehung von p52 von der Salzkonzentration im Spaltungsansatz und von der Zugabe des inhibierenden Oligopeptids unabhängig. Für die p15-Spaltung an der Spaltstelle p30/p10 ist also vermutlich nicht die Aminosäuresequenz der Spaltstelle sondern die Sekundärstruktur des pr65 verantwortlich.

Interessanterweise fand sich bei dem Versuch, aus gereinigten Viruspartikeln isoliertes pr65 in vitro mit p15-Protease zu spalten, ein Spaltungsmuster, das von der Spaltung des aus infizierten Zellen isolierten pr65 abweicht. Das aus den Partikeln isolierte pr65 wird zum größten Teil zu p40 gespalten, es entsteht nur sehr wenig p52. Dieses Ergebnis stärkt die weiter oben bereits erwähnte Hypothese, daß die in vivo nicht gespaltene Fraktion des pr65 möglicherweise einen Defekt an der Spaltstelle p30/p10 hat. Deshalb kann bei der in vitro-Spaltung mit p15-Protease kein p52 entstehen sondern nur das p40. Da dieses "defekte" pr65 in vivo nicht gespalten wird, kann es dann ungespalten in die Viruspartikel eingebaut werden, wo es den überwiegenden Teil des pr65 ausmacht.

In einem zweiten in vitro-Spaltungsversuch wurde versucht, das aus infizierten Zellen isolierte pr65 durch Zugabe des proteolytischen Faktors des SSAV zu spalten (Beschreibung und Diskussion dieses Faktors: vgl. 5.3.). Bei diesem in vitro-Spaltungsversuch entstanden die gleichen Spaltprodukte wie bei der in vivo-Spaltungsreifung des pr65, nämlich das p30, p38 und p52. Allerdings entstehen die drei Spaltprodukte bei der in vitro-Spaltung in einem anderen Verhältnis zueinander als bei der Spaltungsreifung in der Wirtszelle. Während in der Wirtszelle hauptsächlich p30 und p52 auftreten, wurden bei der in vitro-Spaltung des pr65 mit dem proteolytischen Faktor des SSAV in erster Linie p30 und p38 gebildet, jedoch nur sehr wenig p52. Zudem wird das p52 bei Erhöhung der Konzentration des proteolytischen Faktors vollständig zu p30 gespalten.

Unter Zugrundelegung der weiter oben diskutierten Anordnung der vier gag-Proteine auf dem pr65 ergibt sich, daß der proteolytische Faktor des SSAV eine äußerst effektive Spaltung an der Spaltstelle pl2/p30 induziert. Diese Spaltung ist notwendig sowohl für die Bildung des p38 als auch des p30, und diese beiden Proteine sind die beiden Hauptprodukte der Spaltung des pr65 mit dem proteolytischen Faktor. Die Spaltstelle pl2/p30 scheint also auch beim SSAV spezifisch für Serin-Proteasen zu sein, entsprechend den Verhältnissen beim Mäuse-Leukämie-Virus (Yoshinaka und Luftig, 1982). An dieser Stelle hat eine Nicht-Serin-Protease wie z.B. das pl5 praktisch keinen Effekt.

Im Gegensatz dazu kann die Spaltung an der Spaltstelle p30/pl0, bei der das p52 entsteht, sowohl durch eine Serin-Protease wie den proteolytischen Faktor des SSAV als auch durch eine Nicht-Serin-Protease wie das pl5 induziert werden. Es scheint sich also hierbei um eine Spaltstelle zu handeln, die nicht für eine definierte Protease spezifisch ist sondern an der Proteasen unterschiedlicher Spezifität angreifen können.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Spaltung des pr 65 zu p52 bei der in vivo-Spaltungsreifung erheblich effektiver ist als bei der in vitro-Spaltung mit dem proteolytischen Faktor des SSAV und daß diese Spaltung durch Proteasen unterschiedlicher Spezifität induziert werden kann. Daraus läßt sich die Hypothese ableiten, daß auch beim SSAV die initiale Spaltung des Vorstufen-Proteins in vivo durch eine unspezifische, möglicherweise zelluläre Protease induziert werden kann, wie das für das Poliovirus beschrieben ist.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, daß in den freigesetzten Viruspartikeln sowohl das Vorstufen-Protein pr65 als auch der proteolytische Faktor vorhanden ist, stellt sich die Frage, warum in den Viruspartikeln keine Spaltung des pr65 stattfindet. Eine derartige Spaltung konnte weder in intakten Viruspartikeln nachgewiesen werden, noch wurde sie nach Lysierung der Viruspartikel beobachtet. Durch Zugabe von proteolytischem Faktor zu lysierten Viruspartikeln war jedoch eine vollständige Spaltung des in die Partikel eingebauten pr65 induzierbar. Möglicherweise hat also der proteolytische Faktor in den Viruspartikeln eine zu geringe Konzentration, um das pr65 zu spalten, oder aber das pr65 ist in den Viruspartikeln nicht für den proteolytischen Faktor angreifbar sondern muß erst durch Immunpräzipitation aus den Viruspartikeln isoliert werden.

5.3. Der proteolytische Faktor des SSAV

Neben der Charakterisierung der Spaltungsreifung des Vorstufen-Proteins pr65 war es das zweite Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob auch beim SSV/SSAV, wie bei anderen Retroviren der Geflügel und Mäuse (vgl. 2.3.), ein proteolytischer Faktor existiert, der das Vorstufen-Protein des SSAV spezifisch spaltet. Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, konnte tatsächlich ein derartiger Faktor nachgewiesen werden. Dieser Faktor ist in der Lage, das Vorstufen-Protein pr65 des SSAV spezifisch zu spalten, wobei die gleichen Spaltprodukte entstehen wie bei der in vivo Spaltungsreifung des pr65.

Man kann also davon ausgehen, daß es sich bei dem Faktor tatsächlich um die in vivo wirksame proteolytische Aktivität handelt (vgl. 5.2.).

Wie alle bisher bekannten Proteasen der Retroviren ist auch der proteolytische Faktor des SSV/SSAV nicht nur in der infizierten Zelle sondern auch in gereinigten Viruspartikeln nachweisbar. Der Faktor ist mit dem Helfervirus SSV assoziiert, denn er wurde sowohl in SSV/SSAV-Partikeln als auch in SSV-Partikeln gefunden, nicht jedoch in der SSV-transformierten NP-Zelle, die das gesamte Genom des SSV enthält. Für den proteolytischen Faktor des SSV besteht eine große Ähnlichkeit zu der einzigen bisher bekannten Protease eines Säugetier C-Typ Retrovirus, nämlich des Mäuse-Leukämie-Virus. Wie diese gehört auch der proteolytische Faktor des SSV wahrscheinlich zu den Serin-Proteasen (vgl. Yoshinaka und Luftig, 1980), denn er kann durch Inhibitoren der Serin-Proteasen komplett blockiert werden, wohingegen andere Protease-Inhibitoren keinen Einfluß auf seine Aktivität haben. Im Gegensatz dazu gehören die Proteasen des Mamma-Tumor-Virus der Maus und des Hühner-Oncomavirus nicht zu den Serin-Proteasen sondern sie haben große Ähnlichkeit zu den Thiol-Proteasen (Dittmar und Mölling, 1978; Sen et al., 1980).

Auch in anderen Parametern hat der proteolytische Faktor des SSV Ähnlichkeit zu der Protease des Mäuse-Leukämie-Virus. Diese Protease liegt im Molekulargewichtsbereich zwischen 10 und 20000 d (Yoshinaka und Luftig, 1980). Durch Auftrennen der Proteine des SSV über ein Molekularsieb konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß der proteolytische Faktor des SSV ein Mole-

kulargewicht von 10 - 15000 d hat. In den Fraktionen des SSAV, die eine proteolytische Aktivität besaßen, wurde ein Protein mit diesem Molekulargewicht gefunden. Ob der proteolytische Faktor des SSAV mit diesem Protein identisch ist oder ob er nur mit dem Protein assoziiert vorliegt, konnte in dieser Untersuchung nicht geklärt werden. Auf Grund des niedrigen Virustiters beim SSV/SSAV war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, größere Mengen des Faktors zu reinigen. Möglicherweise liegen die Verhältnisse beim SSAV ähnlich wie beim Mäuse-Leukämie-Virus, bei dem der proteolytische Faktor bisher mit Proteinfärbemethoden nicht dargestellt werden konnte (Yoshinaka und Luftig, 1980).

Ob der proteolytische Faktor des SSAV einem Strukturprotein des Virus entspricht wie das p15 des Hühner-On-corna-Virus, konnte nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. Auf Grund ihres Molekulargewichts kämen hierfür die fünf kleineren Strukturproteine des Virus in Frage. Die beiden Glykoproteine p15E/p12E können jedoch wahrscheinlich ausgeschlossen werden, da sie selbst erst durch Spaltungsreifung entstehen und demnach erst relativ spät im Replikationszyklus auftreten.

Des weiteren kommen die drei kleineren Kapsid-Proteine p15, p12 und p10 in Frage. Es erscheint dabei am wahrscheinlichsten, daß der proteolytische Faktor des SSAV, - falls er einem Strukturprotein des Virus entspricht -, mit dem p10 assoziiert ist. Die Verhältnisse lägen damit ähnlich wie beim Hühner-Oncornavirus, bei dem das p15, das ebenfalls C-terminal auf dem Vorstufen-Protein liegt, die Spaltung des Vorstufen-Proteins induziert. Eine ähnliche Hypothese wurde von einer anderen Ar-

beitsgruppe, stimuliert durch frühere Untersuchungen, aufgestellt (Bergholz, 1981).

Andererseits besteht die Möglichkeit, daß der proteolytische Faktor des SSAV nicht mit den Strukturproteinen assoziiert ist, wie das möglicherweise beim Mäuse-Leukämie-Virus der Fall ist (Yoshinaka und Luftig, 1980). Dann stellt sich jedoch die Frage, woher der proteolytische Faktor stammt. Es könnte sich einerseits um eine von der Wirtszelle bereitgestellte Protease handeln, die auch im Viruspartikel gefunden werden kann. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, daß bei der Synthese bzw. Modifikation der Vorstufen-Proteine ein Protein entsteht, das nicht zu den Strukturproteinen zählt und das eine proteolytische Aktivität besitzt. Bisher besteht jedoch kein eindeutiger Hinweis für eine dieser beiden Möglichkeiten, weder beim Mäuse-Leukämie-Virus noch beim SSAV. Für die weitere Untersuchung dieser und der anderen aufgeworfenen Fragen wird es jedoch notwendig sein, größere Mengen des proteolytischen Faktors zu gewinnen, um diesen Faktor mit immunologischen und biochemischen Methoden genauer zu charakterisieren.

Die Ergebnisse dieser Studie und die Beantwortung der darin aufgeworfenen Fragen liefern jedoch bereits einen Beitrag zum Verständnis der Replikation onkogener Retroviren der Primaten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Proteinsynthese der viralen Proteine von Oncorna-Viren erfolgt in der infizierten Zelle über großmolekulare Vorstufen-Proteine, die post translationem in die endgültigen viralen Strukturproteine gespalten werden. Im Falle des Hühner-Oncorna-Virus erfolgt diese Spaltung des Vorstufen-Proteins der gag-Proteine durch eines der eigenen Spaltprodukte, nämlich das gag-Protein p15. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob im System des Primaten-Sarkom-Virus SSV/SSAV eine entsprechende spezifische proteolytische Aktivität vorhanden ist.

Bei der Untersuchung der in vivo-Spaltungsreifung der gag-Proteine konnte nachgewiesen werden, daß in SSV/SSAV-infizierten und transformierten Zellen ein Vorstufen-Protein der gag-Proteine, das pr65, synthetisiert wird. Dieses Protein wird post translationem zu den vier gag-Proteinen gespalten. Hierbei treten zwei Zwischenstufen mit einem Molekulargewicht von 52000 d bzw. 38000 d auf.

Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurde versucht, dieses Vorstufen-Protein durch Zugabe einer proteolytischen Aktivität in vitro zu spalten. Hierzu wurde die Protease des Hühner-Oncorna-Virus, das p15, verwendet. Mit p15 ließ sich das pr65 in vitro vollständig spalten, wobei - wie in der Wirtszelle - das Intermediat von 52000 d entstand. Außer diesem Protein und einer sehr geringen Menge an gag-Protein p30 wurden jedoch bei der

in vitro-Spaltung des pr65 mit p15 noch einige weitere Spaltprodukte gebildet, die in vivo nicht auftreten. Die in vitro-Spaltung mit p15 unterscheidet sich also in wesentlichen Punkten von der in vivo-Spaltungsreifung des pr65.

Hauptziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob auch im System des SSV/SSAV eine proteolytische Aktivität vorhanden ist, die das gag-Vorstufen-Protein dieses Virus zu spalten vermag. In der Tat konnte ein derartiger proteolytischer Faktor nachgewiesen werden. Bei der in vitro-Spaltung mit diesem Faktor entstehen die gleichen Spaltprodukte wie bei der Spaltungsreifung in vivo. Der proteolytische Faktor ist sowohl in SSV/SSAV-infizierten Zellen als auch in gereinigten Viruspartikeln vorhanden. Bei der genaueren Untersuchung konnte gezeigt werden, daß der proteolytische Faktor mit dem Helfervirus SSAV assoziiert ist. Er liegt im Molekulargewichtsbereich zwischen 10000 d und 15000 d und kann durch Inhibitoren der Serin-Proteasen vollständig blockiert werden. Damit weist der proteolytische Faktor des SSAV eine sehr große Ähnlichkeit zur Protease des Mäuse-Leukämie-Virus auf, der einzigen bisher bekannten Protease eines Säugetier-Oncorna-Virus.

7. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

Biologisches Material

AMV	Hühner-Myeloblastose-Virus
GaLV	Gibbon-Leukämie-Virus
MC 29	Myelocytomatose-Virus der Geflügel
MPMV	Mason-Pfizer-Affen-Virus
RSV	Rous Sarkom-Virus
SSAV	Simian-Sarkom-assoziiertes Virus
SSV	Simian-Sarkom-Virus
HF-Zellen	permanente Zell-Linie von Marmoset Fibroblasten
MFS-4 Zellen	permanente Zell-Linie von Marmoset Haut- zellen
NP-Zellen	transformierte, keine Partikel produzie- rende HF-Zellen (<u>Non producer</u>)
NRK-Zellen	permanente Zell-Linie von Nierenzellen der Ratte
"rescue"-Zellen	vgl. S. 19

Reagentien

APS	Ammoniumperoxidisulfat
BES	Bis-hydroxyäthyl-aminoäthansulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Natriumdesoxycholat
DTT	Dithiolthreitol
EDTA	Äthylendiamintetraazetat
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCMB	para-Hydroxymercuribenzoat

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TMED	Tetramethyläthylendiamin

Einheiten

d	Dalton
FBE	Fokus bildende Einheit
KIV	1000 internationale Einheiten
G	Erdbeschleunigung
KB	Kilobasen (1000 Basen)
RI	Refraktionsindex
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle/Minute
A	Ampère
mA	Milliampère
Ci	Curie
mCi	Millicurie
µCi	Mikrocurie
g	Gramm
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
l	Liter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
m	Meter
cm	Zentimeter
mm	Millimeter

µm	Mikrometer
nm	Nanometer
M	molar
mM	millimolar
n	normal

Sonstiges

DMEM	Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
MEM	Minimal Essential Medium
MW	Molekulargewicht
c-onc	zelluläres Onkogen
v-onc	virales Onkogen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDGF	Thrombozyten-abhängiger Wachstumsfaktor
RNS	Ribonukleinsäure
sis	Onkogen des SSV

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aaronson, S.A. (1973): Biologic characterization of mammalian cells transformed by a primate sarcoma virus. *Virology*, 52, 562-567.
2. Aaronson, S.A., Stephenson, J.R., Hino, S. and Tronick, S.R. (1975): Differential expression of helper viral structural polypeptides in cells transformed by clonal isolates of woolly monkey sarcoma virus. *J. Virol.*, 16, 1117-1123.
3. Aaronson, S.A., Stephenson, J.R., Tronick, S.R. and Hino, S. (1976): Immunological analysis of structural polypeptides of woolly monkey-gibbon ape type C viruses. Expression of woolly monkey helper viral antigens in cells transformed by woolly monkey sarcoma virus. In: *Comparative Leukemia Research 1975*, edited by Clemmesen, J. and Yohn, D.S., pp. 102-109. Karger, Basel.
4. Arcement, L.J., Karshin, W.L., Naso, R.B., Jamjoom, G. and Arlinghaus, R.B. (1976): Biosynthesis of Rauscher Leukemia viral proteins: presence of p30 and envelope p15 sequences in precursor polypeptides. *Virology*, 69, 763-774.
5. Baltimore, D. (1970): Viral RNA-dependent DNA polymerase. *Nature*, 226, 1209-1211.
6. Bergholz, C.M., Wolfe, L.G. and Deinhardt, F. (1977): Establishment of simian sarcoma virus type 1 (SSV-1)-transformed nonproducer marmoset cell lines. *Int. J. Cancer*, 20, 104-111.
7. Bergholz, C.M. (1981): Synthesis of virus-specific proteins in simian sarcoma virus-transformed primate cells. *Virology*, 114, 113-123.
8. Bernhard, W. (1958): Electron microscopy of tumor cells and tumor viruses. A review. *Cancer Res.*, 18, 491.
9. Bernhard, W. (1960): The detection and study of tumor viruses with the electron microscope. *Cancer Res.*, 20, 712-727.

10. Bister, K., Hayman, M.J., Vogt P.K. (1977): Defectiveness of avian myelocytomatosis virus MC 29: Isolation of long term nonproducer cultures and analysis of viral specific polypeptide synthesis. *Virology*, 82, 431-448.
11. Born, M. (1981): Biologische und biochemische Merkmale von Simian-Sarkom-Virus transformierten Marmosetzellen. Dissertation am Fachbereich Medizin der Universität Giessen.
12. Born, M., von der Helm, K. and Deinhardt, F. (1982): Virus-specific phosphoproteins in simian sarcoma virus-transformed primate cells. *The EMBO Journal*, 1, 1029-1033.
13. Brugge, J.S. and Erikson, R.L. (1977): Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature*, 269, 346-348.
14. Burrell, C.J., Martin, E.M. and Cooper, P.D. (1970): Posttranslational cleavage of virus polypeptides in arbovirus-infected cells. *J. gen. Virol.*, 6, 319-323.
15. Chopra, H.C. and Mason, M.M. (1970): A new virus in a spontaneous mammary tumor of a rhesus monkey. *Cancer Res.*, 30, 2081-2086.
16. Collet, M.S. and Erikson, R.L. (1978): Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75, 2021-2024.
17. Collins, J.K. and Chesebro, B. (1981): Replication-defective Friend murine leukemia virus particles containing uncleaved gag polyproteins and decreased levels of envelope glycoprotein. *J. Virol.*, 37, 161-170.
18. Dalla Favera, R., Gelmann, E.P., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F. (1981): A human onc gene homologous to the transforming gene (v-sis) of simian sarcoma virus. *Nature*, 292, 31-35.
19. Dalton, A.J., Melnick, J.L., Bauer, H., Beaudreau, G., Bentvelzen, P., Bolognesi, D.P., Gallo, R.C., Graffi, A., Haguenau, F., Heston, W., Huebner, R., Todaro, G. and Heine, V.I. (1974): The case for a

family of reverse transcriptase viruses: Retroviridae. Intervirology, 4, 201-206.

20. Deinhardt, F., Wolfe, L., Northrop, R., Marczynska, B., Ogden, J., McDonald, R., Falk, L., Shramek, G., Smith, R. and Deinhardt, J. (1972): Induction of neoplasms by viruses in marmoset monkeys. J. Med. Primatol., 1, 29-50.
21. Deinhardt, F., Bergholz, C., Hunsmann, G., Schneider, J. Thiel, H.-J., Beug, H. and Schäfer, W. (1978): Studies of simian sarcoma and simian sarcoma associated virus. I. Analysis of viral structural proteins, and preparation and characterization of antiserum specific for viral envelope components. Z. Naturforsch., 33, 969-980.
22. Deinhardt, F. (1980): Biology of primate retroviruses. In: Viral Oncology edited by G. Klein, Raven Press, New York.
23. Devare, S.G., Reddy, E.P., Robbins, K.C., Andersen, P.R., Tronick, S.R. and Aaronson, S.A. (1982): Nucleotide sequence of the transforming gene of simian sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sc., USA, 79, 3179-3182.
24. Dittmar, K.J. and Moelling, K. (1978): Biochemical properties of p15-associated protease in an avian RNA tumor virus. J. Virol., 28, 106-118.
25. Doolittle, R.F., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Devare, S.G., Robbins, K.C., Aaronson, S.A. and Antoniades, H.N. (1983): Simian sarcoma virus onc gene v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. Science, 221, 275-277.
26. Duesberg, P., Vogt, P.K., Beemon, K. and Lai, M. (1974): Avian RNA tumor viruses: mechanism of recombination and complexity of the genome. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., 39, 847-857.
27. Eagle, H. (1959): Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science, 130, 432-437.
28. Eisenmann, R., Vogt, V.M. and Diggelmann, H. (1975): Synthesis of avian tumor virus structural proteins. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., 39, 1067-1075.

29. Feldman, R.A., Hanafusa, T. and Hanafusa, H. (1980): Characterization of protein kinase activity associated with the transforming gene product of Fujinami sarcoma virus. *Cell*, 22, 757-765.
30. Fidanian, H.M., Drohan, W.N. and Baluda, M.A. (1975): RNA of simian sarcoma-associated virus type 1 produced in human tumor cells. *J. Virol.*, 15, 449-457.
31. Frixen, V., von der Helm, K., Friis, R., Wille, W. and Willecke, K. (1982): Fusion-injection of Rous sarcoma virus proteins into Rous sarcoma virus-transformed, non-producing hamster cells causes release of infectious virus. *J. gen. Virol.*, 61, 83-86.
32. Gelderblom, H., Bauer, H., Ogura, H., Wigand, R. and Fischer, A.B. (1974): Detection of oncornavirus-like particles in Hela cells. I. Fine structure and comparative morphological classification. *Int. J. Cancer*, 13, 246-253.
33. Gelmann, E.P., Wong-Staal, F., Kramer, R.A. and Gallo, R.C. (1981): Molecular cloning and comparative analysis of the genomes of simian sarcoma virus and its associated helper virus. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78, 3373-3377.
34. Gelmann, E.P., Petri, E., Cetta, A. and Wong-Staal, F. (1982): Deletions of specific regions of the simian sarcoma-associated virus genome are found in defective viruses and in the simian sarcoma virus. *J. Virol.*, 41, 593-604.
35. Hanecak, R., Semler, B.L., Anderson, C.W. and Wimmer, E. (1982): Proteolytic processing of poliovirus polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 79, 3973-3977.
36. Hayman, M.J., Royer-Pokara, B. and Graf, T. (1979): Defectiveness of avian erythroblastosis virus: Synthesis of a 75K gag-related protein. *Virology*, 92, 31-45.
37. Hinuma, Y., Nagata, K., Hanaoka, M., Nakai, M., Matsumoto, T., Kinoshita, K.I., Shirakawa, S. and Miyoshi, I. (1981): Adult T-cell leukemia: Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78, 6476-6480.

38. Holland, J.J., Kiehn, E.D. (1968): Specific cleavage of viral proteins as steps in the synthesis and maturation of enteroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 60, 1015-1022.
39. Hunter, T. and Sefton, B.M. (1980): Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77, 1311-1315.
40. Jacobson, M.F. and Baltimore, D. (1968): Polypeptide cleavages in the formation of poliovirus proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 61, 77-84.
41. Jamjoom, G.A., Naso, R.B. and Arlinghaus, R.B. (1976): Selective decrease in the rate of cleavage of an intracellular precursor to Rauscher leukemia virus p30 by treatment of infected cells with actinomycin D. *J. Virol.*, 19, 1054-1072.
42. Jensik, S., Hoekstra, J., Silver, S., Northrop, R.L. and Deinhardt, F. (1973): The 60 to 70 S RNA and reverse transcriptase of simian sarcoma and simian sarcoma-associated viruses. *Intervirology*, 1, 229-241.
43. Johnson, L., Jr., Wolfe, L.G., Whisler, W.W., Norton, T., Thakkar, B. and Deinhardt, F. (1975): Induction of gliomas in marmosets by simian sarcoma virus, type 1 (SSV-1). *Asst. Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 16, 119.
44. Kalyanaraman, V.S., Sarugadharan, M.G., Bunn, P.A., Minna, J.D. and Gallo, R.C. (1981): Antibodies in human sera reactive against an internal structural protein of human T-cell lymphoma virus. *Nature*, 294, 271-273.
45. Kawai, S., Yoshida, M., Segawa, K., Sugiyama, H., Isizaki, R. and Toyoshima, K. (1980): Characterization of Y 73, an avian sarcoma virus: a unique transforming gene and its product, a phosphoprotein with protein kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77, 6199-6203.
46. Khan, A.S. and Stephenson, J.R. (1977): Feline leukemia virus: biochemical and immunological characterization of gag gene-coded structural proteins. *J. Virol.*, 23, 599-607.

47. Khan, A.S., Deobaghar, D.N. and Stephenson, J.R. (1978): Isolation and characterization of a feline sarcoma virus-coded precursor polyprotein: competition immunoassay for a nonstructural component. *J. Biol. Chem.*, 253, 8894-8901.
48. Khan, A.S. and Stephenson, J.R. (1979): Feline sarcoma virus-coded polyprotein: enzymatic cleavage by a type C virus-coded structural protein. *J. Virol.*, 29, 649-656.
49. Konze-Thomas, B. and von der Helm, K. (1981): Proteolytic processing of avian and simian sarcoma and leukemia virus proteins. In: Neth, R., Gallo, R., Graf, T., Mannweiler, K. and Winkler, K. (editors), *Haematology and Blood Transfusion. Modern Trends in Human Leukemia*, IV, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 409-413.
50. Korant, B.D. (1973): Cleavage of poliovirus-specific polypeptide aggregates. *J. Virol.*, 12, 556-563.
51. Kung, H.J., Hu, S., Bender, W., Bailey, J.M., Davidson, N., Nicholson, M.O. and McAllister, R.M. (1976): RD-114 baboon and woolly monkey viral RNAs compared in size and structure. *Cell*, 7, 609-620.
52. Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
53. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
54. Moelling, K., Scott, A., Dittmar, K.J. and Owada, M. (1980): Effect of p15-protease from an avian RNA tumor virus on avian virus-specific polyprotein precursors. *J. Virol.*, 33, 680-688.
55. Naso, R.B., Arcement, L.J. and Arlinghaus, R.B. (1975): Biosynthesis of Rauscher leukemia viral proteins. *Cell*, 4, 31-36.
56. Neil, J.C., Ghysdeel, J. and Vogt, P.K. (1981): Tyrosine-specific kinase activity associated with p105 of avian sarcoma virus Pr C II. *Virology*, 109, 223-228.

57. Oakley, B.R., Kirsch, D.R. and Morris, R.N. (1980): A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 105, 361-363.
58. Pinter, A. and de Harven, E. (1979): Protein composition of a defective murine sarcoma virus particle possessing the enveloped type-A morphology. *Virology*, 99, 103-110.
59. Poiesz, B. J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D. and Gallo, R.C. (1980): Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77, 7415-7419.
60. Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Reitz, M.S., Kalyanaraman, V.S. and Gallo, R.C. (1981): Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sézary T-cell leukemia. *Nature*, 294, 268-271.
61. Reynolds, F.H. Jr., van de Ven, W.J. and Stephenson, J. (1980): Feline sarcoma virus p115-associated protein kinase activity phosphorylates tyrosine. Identification of a cellular substrate conserved during evolution. *J. Biol. Chem.*, 255, 11040-11047.
62. Robbins, K.C., Devare, S.G. and Aaronson, S.A. (1981): Molecular cloning of integrated simian sarcoma virus: genome organization of infectious DNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78, 2918-2922.
63. Robbins, K.C., Hill, R.L. and Aaronson, S.A. (1982a): Primate origin of the cell-derived sequences of simian sarcoma virus. *J. Virol.*, 41, 721-725.
64. Robbins, K.C., Devare, S.G., Reddy, E.P. and Aaronson, S.A. (1982b): *In vitro* identification of the transforming gene product of simian sarcoma virus. *Science*, 218, 1131-1133.
65. Rohrschneider, L.R., Eisenmann, R.N. and Leitch, C.R. (1979): Identification of a Rous sarcoma virus transformation-related protein in normal avian and mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 76, 4479-4483.

66. Schlesinger, S. and Schlesinger, M.J. (1972): Formation of Sindbis virus proteins: identification of a precursor for one of the envelope proteins. *J. Virol.*, 10, 925-932.
67. Scolnick, E.M., Parks, W.P., Todaro, G.J. and Aaronson, S.A. (1972): Immunological characterization of primate C-type virus reverse transcriptases. *Nature*, 235, 35-40.
68. Scolnick, E.M. and Parks, W.P. (1973): Isolation and characterization of mammalian cells transformed by a primate sarcoma virus: mechanisms of rescue. *Int. J. Cancer*, 12, 138-147.
69. Scolnick, E.M., Goldberg, R.J. and Williams, D. (1976): Characterization of rat genetic sequences of Kirsten sarcoma virus: distinct classes of endogenous rat type C viral sequences. *J. Virol.*, 18, 559-566.
70. Sen, G.C., Haspel, H.C. and Sarkar, N.H. (1980): Presence of a proteolytic activity in murine mammary tumor virus. *J. Biol. Chem.*, 255, 7098-7101.
71. Shih, T.Y., Weeks, M.O., Young, H.A. and Scolnick, E.M. (1979): Identification of a sarcoma virus-coded phosphoprotein in nonproducer cells transformed by Kirsten or Harvey murine sarcoma virus. *Virology*, 96, 64-79.
72. Summers, D.F. and Maizel, J.V. Jr. (1968): Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 59, 966-971.
73. Svoboda, J., Popovic, M., Sainerova, H., Mach, O., Shoyab, M. and Baluda, M. (1977): Incomplete viral genome in a non-virogenic mouse tumor cell line (RVP₃) transformed by Prague strain of avian sarcoma virus. *Int. J. Cancer*, 19, 851-858.
74. Temin, H.M. and Rubin, H. (1958): Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture. *Virology*, 6, 669-688.
75. Temin, H. and Mizutani, S. (1970): RNA dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226, 1211-1213.

76. Temin, H. and Baltimore, D. (1972): RNA directed DNA synthesis and RNA tumor viruses. *Adv. Cancer Res.*, 117, 129-186.
77. Theilen, G.H., Gould, D., Fowler, M. and Dungworth, D.L. (1971): C-type virus in tumor tissue of a woolly monkey (*Lagothrix* spp.) with fibrosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 47, 881-889.
78. Thiel, H.-J., Bergholz, C., Beug, H., Deinhardt, F., Schwarz, H. and Schäfer, W. (1977): Isolation of the major glycoprotein (gp70) of simian sarcoma virus (SSV-1/SSAV-1) in preparative quantities. *Z. Naturforsch. (C)*, 32, 884-886.
79. Thiel, H.-J., Beug, H., Graf, T., Schwarz, H., Schäfer, W., Bergholz, C. and Deinhardt, F. (1978): Studies of simian sarcoma and simian sarcoma-associated virus. II. Isolation of the major viral glycoprotein, properties of this component and its specific antiserum. *Virology*, 90, 360-365.
80. Thiel, H.-J., Matthews, T.J., Broughton, E.M., Weinhold, K.J., Bolognesi, D.P., Graf, T. and Beug, H. (1981a): Clonal isolate of the simian sarcoma virus codes for a gag-related 65000 Dalton protein. *Virology*, 114, 124-131.
81. Thiel, H.-J., Matthews, T.J., Weinhold, K.J. and Broughton, E.M. (1981b): Identification of a 20000-Dalton protein in SSV-transformed nonproducer cells. *Virology*, 115, 401-405.
82. Thiel, H.-J., Matthews, T.J., Broughton, E.M., Butchko, A.W. and Bolognesi, D.P. (1981c): Detection of a transformation-specific glycopeptide in SSV-infected cells. *Virology*, 112, 642-650.
83. Thiel, H.-J., Weiland, F., Hafenrichter, R., Matthews, T.J. and Weinhold, K.J. (1982): Intracellular cleavage of an SSV coded gag-related protein. *Virology*, 123, 229-234.
84. Toplin, I. and Sottong, P. (1972): Large volume purification of tumor viruses by use of zonal centrifugation. *Appl. Microbiol.*, 23, 1010-1014.

85. Van De Ven, W.J.M., Reynolds, F.H. Jr. and Stephenson, J.R. (1980): The nonstructural components of polyproteins encoded by replication-defective mammalian transforming retroviruses are phosphorylated and have associated protein kinase activity. *Virology*, 101, 185-197.
86. Van Zaane, D., Gielkens, A.L.J., Dekker-Michielsen, M.J.A. and Bloemers, H.P.J. (1975): Virus-specific precursor polypeptides in cells infected with Rauscher leukemia virus. *Virology*, 67, 544-552.
87. Van Zaane, D., Dekker-Michielsen, M.J.A. and Bloemers, H.P.J. (1976): Virus-specific precursor polypeptides in cells infected with Rauscher leukemia virus: Synthesis, identification, and processing. *Virology*, 75, 113-129.
88. Vogt, V.M. and Eisenman, R. (1973): Identification of a large polypeptide precursor of avian oncornavirus proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 70, 1734-1738.
89. Vogt, V.M., Eisenman, R. and Diggelmann, H. (1975): Generation of avian myeloblastosis virus structural proteins by proteolytic cleavage of a precursor polypeptide. *J. Mol. Biol.*, 96, 471-493.
90. Vogt, V.M., Wight, A. and Eisenman, R. (1979): In vitro cleavage of avian retrovirus gag proteins by viral protease p15. *Virology*, 98, 154-167.
91. Von der Helm, K. and Duesberg, P.H. (1975): Translation of Rous sarcoma virus RNA in cell-free systems from ascites Krebs II cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 72, 614-618.
92. Von der Helm, K. (1977): Cleavage of Rous sarcoma viral polypeptide precursor into internal structural proteins in vitro involves viral protein p15. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74, 911-915.
93. Von der Helm, K., Kempeni, J., Wille, W. and Willecke, K. (1980): Rous sarcoma virus precursor protein pr76 is processed in avian sarcoma virus-transformed mammalian cells after fusion-injection of viral protein p15. *Virology*, 106, 310-316.

94. Von der Helm, K. and Konze-Thomas, B. (1980): Avian oncornavirus contain a virus coded protease (p15) which processes its own gag protein precursor and the 110kd polypeptide of MC29. Arch. Geschwulstforsch., 50, 299-305.
95. Von der Helm, K. and Konze-Thomas, B. (1981): Inhibition of viral maturation and assembly by blocking the precursor processing - a project design. In Antiviral Chemotherapy, Academic Press Inc.
96. Von der Helm, K. and Rose, D.: Inhibition of processing of gag precursor protein and of release of infectious Rous sarcoma virus by an oligopeptide. In: Antiviral Agents, edited by K. Gauri, Academic Press, New York, in press.
97. Wasteson, A., Westermarck, B., Heldin, C.-H., Huang, J.S. and Deuel, T.F. (1983): Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28^{sis} of simian sarcoma virus. Nature, 304, 35-39.
98. Witte, O.N., Rosenberg, N., Paskind, M., Shields, A. and Baltimore, D. (1978): Identification of an Abelson murine leukemia virus encoded protein present in transformed fibroblast and lymphoid cells. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75, 2488-2492.
99. Witte, O.N., Dasgupta, A. and Baltimore, D. (1980): Abelson murine leukemia virus protein is phosphorylated in vitro to form phosphotyrosine. Nature, 283, 826-831.
100. Wolfe, L.G., Deinhardt, F., Theilen, G.H., Rabin, H., Kawakami, T. and Bustad, L.K. (1971): Induction of tumors in marmoset monkeys by simian sarcoma virus, type 1 (Lagothrix). A preliminary report. J. Natl. Cancer Inst., 47, 1115-1120.
101. Wolfe, L.G., Smith, R.K. and Deinhardt, F. (1972): Brief communication. Simian sarcoma virus, type 1 (Lagothrix): focus assay and demonstration of non-transforming associated virus. J. Natl. Cancer Inst., 48, 1905-1908.
102. Wolfe, L.G. and Deinhardt, F. (1972): Oncorna-viruses associated with spontaneous and experimentally induced neoplasia in nonhuman primates. A review. Med. Primatol., 1972, III, 176-196.

103. Wong-Staal, F., Dalla Favera, R., Franchini, G., Gelmann, E.P. and Gallo, R.C. (1981a): Three distinct genes in human DNA related to the transforming genes of mammalian retroviruses. *Science*, 213, 226-228.
104. Wong-Staal, F., Dalla Favera, R., Gelmann, E.P., Manzari, V., Szala, S., Josephs, S.F. and Gallo, R.C. (1981b): The v-sis transforming gene of simian sarcoma virus is a new onc gene of primate origin. *Nature*, 294, 273-275.
105. Yoshinaka, Y. and Luftig, R.B. (1977a): RLV morphogenesis: cleavage of p70 can be accompanied by a morphological conversion from an immature to a mature form of the core. *Fed. Proc.*, 36, 740.
106. Yoshinaka, Y. and Luftig, R.B. (1977b): Partial characterization of a p70 proteolytic factor that is present in purified virions of Rauscher leukemia virus (RLV). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76, 54-63.
107. Yoshinaka, Y. and Luftig, R.B. (1977c): Properties of a p70 proteolytic factor of murine leukemia viruses. *Cell*, 12, 709-719.
108. Yoshinaka, Y. and Luftig, R.B. (1978): Morphological conversion of "immature" Rauscher leukemia virus cores to a "mature" form after addition of the p65 - 70 (gag gene product) proteolytic factor. *J. gen. Virol.*, 40, 151-160.
109. Yoshinaka, Y. and Luftig, R.B. (1980): Physicochemical characterization and specificity of the murine leukemia virus pr65 gag proteolytic factor. *J. gen. Virol.*, 48, 329-340.
110. Yoshinaka, Y. and Luftig, R.B. (1981): Inhibition of murine leukemia virus pr65 gag cleavage in vitro and in vivo by hypertonic medium. *J. Virol.*, 37, 1066-1070.
111. Yoshinaka, Y. and Luftig, R.B. (1982): P65 of Gazdar murine sarcoma viruses contains antigenic determinants from all four of the murine leukemia virus (MuLV) gag polypeptides (p15, p12, p30, and p10) and can be cleaved in vitro by the MuLV proteolytic activity. *Virology*, 118, 380-388.

L E B E N S L A U F

- 11.2.1958 geboren in Passau als Sohn des Universitäts-
Professors Dr. Horst Kräusslich und seiner
Ehefrau Anneliese geb. Knie
- 1964-1967 Besuch der Volksschule an der Herrnstrasse,
München
- 1967-1968 Besuch der Volksschule Gauting
- 1968-1977 Besuch des Karlsgymnasiums, München-Pasing
- Mai 1977 Abitur
- Nov. 1977 Beginn des vorklinischen Abschnitts des
Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität, München
- Aug. 1979 Physikum
- Nov. 1979 Beginn des klinischen Abschnitts des
Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität, München
- Aug. 1980 1. Staatsexamen
- Aug. 1983 2. Staatsexamen
- Nov. 1980 -
Aug. 1982 Doktorarbeit am Max von Pettenkofer Insti-
tut für medizinische Mikrobiologie der
Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Nov. 1984 Voraussichtliche Beendigung des Medizin-
studiums mit dem schriftlichen und münd-
lichen Teil des 3. Staatsexamens

